

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁵ : C12N 15/61, 15/53, 15/80, 1/15, 9/90 // 9/02, C12P 21/04	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 94/25606 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 10. November 1994 (10.11.94)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP94/01272 (22) Internationales Anmeldedatum: 23. April 1994 (23.04.94) (30) Prioritätsdaten: P 43 12 856.4 23. April 1993 (23.04.93) DE P 43 14 610.4 4. Mai 1993 (04.05.93) DE P 43 16 419.6 17. Mai 1993 (17.05.93) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser AT DE US): SANDOZ LTD. [CH/CH]; Lichtstrasse 35, CH-4002 Basel (CH). (71) Anmelder (nur für DE): SANDOZ-PATENT-GMBH [DE/DE]; Humboldtstrasse 3, D-79539 Lörrach (DE). (71) Anmelder (nur für AT): SANDOZ-ERFINDUNGEN VER- WALTUNGSGESELLSCHAFT MBH [AT/AT]; Brunner Strasse 59, A-1230 Wien (AT). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KOCHER, Hans, Pe- ter [CH/CH]; Rebenstrasse 1, CH-4125 Riehen (CH). SCHNEIDER-SCHERZER, Elisabeth [AT/AT]; Cani- siusweg 125 Top 34, A-6064 Rum (AT). SCHOERGEN- DORFER, Kurt [AT/AT]; A-6322 Unterlangkampfen Nr.	367 (AT). WEBER, Gerhard [DE/DE]; Egelseeweg 15, D-83088 Kiefersfelden (DE). (74) Gemeinsamer Vertreter: SANDOZ LTD.; Patent & Marken Abteilung, Lichtstrasse 35, CH-4002 Basel (CH). (81) Bestimmungsstaaten: JP, SI, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(54) Title: RECOMBINANT ALANINE RACEMASE AND GAPDH FROM TOLYPOCLADIUM (54) Bezeichnung: REKOMBINANTE ALANIN RACEMASE UND GAPDH AUS TOLYPOCLADIUM NIVEUM (57) Abstract The invention concerns nucleotide sequences coding for enzymes which exhibit an alanine racemase activity, plus methods of preparing alanine racemase which use these sequences. The invention also concerns methods of preparing cyclosporin and cyclosporin derivatives. The invention further relates to DNA fragments with part or all of the gene for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) from <i>Tolypocladium niveum</i> , its promoter and termination region, and the use thereof. Another aspect of the invention relates to vectors, and cells transformed by these vectors. (57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft Nukleotid-Sequenzen die für Enzyme kodieren, die eine Alanin Racemase Aktivität besitzen und Methoden zur Herstellung von Alanin Racemase, die diese Sequenzen benutzen. Die Erfindung betrifft auch Methoden zur Herstellung von Cyclosporin und Cyclosporin-Derivate. Ferner ist die Erfindung auf neue DNA-Fragmente mit einem Teil oder dem ganzen Gen für die Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) aus <i>Tolypocladium niveum</i> , dessen Promotor- und Terminations-Region, sowie deren Verwendung gerichtet. In einem anderen Aspekt bezieht sich die Erfindung auch auf neue Vektoren und Zellen, die mit diesen Vektoren transformiert wurden.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauritanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

REKOMBINANTE ALANIN RACEMASE UND GAPDH AUS *TOLYPOCLADIUM NIVEUM*

Die Erfindung betrifft Nukleotid-Sequenzen, die für Enzyme kodieren, die eine Alanin Racemase Aktivität besitzen und Methoden zur Herstellung von Alanin Racemase, die diese Sequenzen benutzen. Die Erfindung betrifft auch Methoden zur Herstellung von Cyclosporin und Cyclosporin-Derivaten. Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung neue DNA-Fragmente mit einem Teil oder dem ganzen Gen für die Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) aus *Tolypocladium niveum*, dessen Promotor- und Terminations-Region, sowie deren Verwendung. In einem anderen Aspekt bezieht sich die Erfindung auch auf neue Vektoren und Zellen, die mit diesen Vektoren transformiert wurden.

Der Pilz *Tolypocladium niveum* ist mikrobiologisch in die Klasse der imperfekten Pilze einzuordnen und ist besonders wegen seiner Fähigkeit, Cyclosporine zu bilden von biotechnologischem Interesse (Dreyfuss et al., 1976). Als Cyclosporine wird eine Klasse von zyklischen Undeka-peptiden, die aus hydrophoben, aliphatischen Aminosäuren aufgebaut sind, bezeichnet. Diese Substanzen zeigen vielfältige biologische Effekte: der Hauptmetabolit Cyclosporin A wird aufgrund seiner immunsuppressiven Wirkung als wichtigstes Medikament zur Verhinderung von Organabstoßungen nach Transplantation eingesetzt.

Dementsprechend ist die Entwicklung geeigneter Techniken zur genetischen Manipulation dieses und verwandter Organismen, die Cyclosporine produzieren, oder die einen Einfluss auf die Cyclosporinproduktion besitzen, von großer Bedeutung. Dabei kann eine solche Technik nicht nur zur Steigerung der Produktion bekannter Cyclosporine, sondern auch zur Produktion neuer Wirkstoffe oder anderer Substanzen beitragen. Speziell die regulatorischen Bereiche des GAPDH-Gens, wie der Promoterbereich, können bekanntlich zur effektiven Transkription verschiedener Gene verwendet werden und sind daher bedeutend für deren starke Expression.

Mit der Entwicklung der Gentechnologie wurde in den letzten Jahren die biotechnologische Produktion zahlreicher Polypeptide mittels rekombinanter DNA möglich. Zwei der Voraussetzungen dafür sind einerseits das entsprechende Gen, dessen Produkt hergestellt werden soll, und andererseits geeignete DNA-Konstruktionen durch deren Hilfe das Gen möglichst effizient in der entsprechenden Wirtszelle exprimiert wird.

Die Biosynthese der Cyclosporine erfolgt, wie auch für andere Peptid-Antibiotika

beschrieben, nach dem nicht-ribosomalen Thiotemplate-Mechanismus (Kleinkauf und von Döhren, 1990). Bemerkenswert ist, daß die gesamte Biosynthese von einem Multienzym gesteuert wird, welches aus einer einzigen Polypeptidkette besteht und Cyclosporin Synthetase genannt wird. Dieses Enzym wurde biochemisch gereinigt und charakterisiert (Schmidt et al., 1992).

Cyclosporin A enthält drei nicht proteinogene Aminosäuren: D-Alanin in Position 8, α -Aminobuttersäure in Position 3 und die ungewöhnliche Aminosäure (4R)-4-[(E)-2-Butenyl]-4-Methyl-L-Threonin (Bmt) an Position 1. Solche nicht proteinogenen Aminosäuren sind charakteristische Bestandteile von Peptid-Antibiotika. In Bezug auf den Einbau von D-Aminosäuren wurde in den bisher untersuchten Peptidsynthetasen festgestellt, daß die L-Aminosäure vom Enzym aktiviert, das heißt, als Thioester gebunden, und dann direkt am Enzym epimerisiert wird.

Die Cyclosporin Synthetase besitzt im Gegensatz dazu keine integrale Epimerase-Funktion (Kleinkauf und von Döhren, 1990): sie muß D-Alanin als Baustein für die Biosynthese zugeführt bekommen. *Tolypocladium niveum* muß daher über eine Alanin Racemase verfügen. Da die Cyclosporin Biosynthese an der Position 8 mit der Aktivierung von D-Alanin startet (Lawen et al., 1992), kommt dieser Racemase eine Schlüsselfunktion im Biosynthese-Ablauf zu. Nachdem die Cyclosporin Synthetase *in vitro* durchaus in der Lage ist, an Position 8 auch andere Aminosäuren zu akzeptieren (Lawen et al., 1989), könnte die Inhibition der Racemase-Aktivität oder eine Veränderung der Spezifität *in vivo* einen neuen fermentativen Zugang zu Cyclosporinen mit Variation in der Position 8 eröffnen.

Bemerkenswert ist auch, daß alle bisher beschriebenen Alanin Racemasen prokaryontischen Ursprungs sind. Die Hauptfunktion der prokaryontischen Alanin Racemasen besteht in der Bereitstellung von D-Alanin für die Zellwandsynthese. Die Hemmung dieser Enzyme als antibiotisches Prinzip wurde daher sehr intensiv untersucht (Thornberry et al., 1987). Alanin Racemase aus *Tolypocladium niveum* ist das erste Enzym dieser Klasse, welches aus einem eukaryontischen Organismus isoliert wurde.

In einem Aspekt bezieht sich die Erfindung auf eine isolierte Nukleotid-Sequenz die für ein eukaryontisches Enzym, oder ein Fragment davon, kodiert, das Alanin-Racemase Aktivität besitzt. In der vorliegenden Beschreibung ist ein Enzym, das Alanin Racemase Aktivität besitzt, ein Enzym, das D-Alanin oder L-Alanin in ein Gemisch beider Enantiomere überführt.

Vorzugsweise, codiert die Nukleotid-Sequenz für Alanin Racemase aus Tolypocladium niveum ATCC 34921 oder für ein Enzym, das Alanin-Racemase Aktivität besitzt und zu mindestens 70% (zum Beispiel zu mindestens 80, 90 oder 95%) hierzu homolog ist. Dies soll bedeuten, dass die Erfindung neben der in Abbildung 5 angegebenen Nukleotid-Sequenz auch eine solche beinhaltet, die für Protein codiert, das im wesentlichen ähnliche Aktivität und/oder Funktion aufweist, wobei die Aminosäuresequenz zumindestens zu 70% (zum Beispiel zu mindestens 80, 90 oder 95%) solche Aminosäuren enthält, wie jene Aminosäuresequenz, für die die in Abbildung 5 angegebene Nucleotid-Sequenz codiert, und wobei in der einen oder anderen Position Aminosäuren konservativ ausgetauscht sein können. Folgender konservativer Austausch ist beispielsweise möglich:

- (i) Alanin, Serin und Threonin;
- (ii) Glutaminsäure und Asparaginsäure;
- (iii) Arginin und Lysin;
- (iv) Asparagin und Glutamin;
- (v) Isoleucin, Leucin, Valin und Methionin;
- (vi) Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan.

Betreffend mRNA sind die folgenden Codons synonym, das heisst sie codieren jeweils für die gleiche oder konservativ austauschbare Aminosäure:

- i) UUU, UUC, UAU und UCG;
- ii) UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG, AUU, AUC, AUA, GUU, GUC, GUA und GUG;
- iii) UCU, UCC, UCA, UCG, AGU, AGC, ACU, ACC, ACA, ACG, GCU, GCC, CGA und GCG;
- iv) CCU, CCC, CCA und CCG;
- v) UAA, UAG, und UGA;
- vi) CAU und CAC;
- vii) CAA, CAG, AAU und AAC
- viii) AAA, AAG, CGU, CGC, CGA, CGG, AGA und AGG;
- ix) GAU, GAC, GAA und GAG;
- x) UGU und UGC;
- xi) AGU und AGC;
- xii) GGU, GGC, GGA und GGG.

Betreffend die korrespondierende DNA Sequenz sind Triplets, die in den einzelnen, obigen Punkten angegeben sind, ebenfalls synonym. Nucleotidsequenzen, die für jenes Strukturgen codieren, das in der Abbildung 5 angegeben ist und in denen solche synonymen Triplets äquivalent enthalten sind, sind ebenfalls von der Erfindung umfasst.

Die vorliegende Beschreibung betrifft daher unter einem Aspekt neue DNA-Fragmente mit einem Teil oder dem ganzen Gen für die Alanin Racemase aus *Tolypocladium niveum*, dessen Promotor- und Terminationsregion, sowie deren Verwendung für die Stammverbesserung. In einem anderen Aspekt bezieht sich die Erfindung auch auf neue Nukleotid-Moleküle, Vektoren und Zellen, die mit diesen Vektoren transformiert wurden. Ebenso wird die Konstruktion von Stämmen beschrieben, die sich besonders gut für Verfahren zur Herstellung von modifizierten Cyclosporinen, welche an der Position 8 andere Aminosäuren als D-Alanin enthalten, eignen. In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung einen Teil oder das ganze GAPDH-Gen aus *Tolypocladium niveum*, wobei mit "einem Teil" eine mindestens 70% (zum Beispiel zu mindestens 80, 90 oder 95%) hierzu homologe DNA Sequenz zu verstehen ist, die synonyme Triplets enthalten kann, wie oben für den Fall der Alanin Racemase beschrieben ist, gemeint ist, ferner dessen Promotor- und dessen Terminations-Region, für die die obigen Ausführungen betreffend homologe DNA Sequenzen ebenfalls gelten, und deren Verwendung. Die Erfindung umfasst ferner auch solche Gene, deren Genprodukt mit Antikörpern gegen das ganze oder gegen Teile des, von den erfindungsgemässen Genen jeweils codierten, Proteins, gebunden oder immunoprecipitiert wird, sofern diese Genprodukte eine im wesentlichen ähnliche Funktion oder Wirksamkeit aufweisen.

Ferner umfasst die Erfindung auch Nucleotidsequenzen, die den erfindungsgemässen Nucleotidsequenzen ähnlich sind. Mit "ähnlich" ist jeweils eine Testsequenz gemeint, die jeweils gegen eine der erfindungsgemässen Sequenzen hybridisieren kann. Bei doppelsträngigen Sequenzen können die Testsequenz und die erfindungsgemässe Sequenz einen TM-Unterschied von bis zu etwa 15°C besitzen. Die Hybridisierung wird unter stringenten Bedingungen ausgeführt, wobei entweder die Testsequenz oder eine der erfindungsgemässen Sequenzen auf einen Träger aufgebracht wird. Entweder eine denaturierte Test- oder eine der erfindungsgemässen Sequenzen wird somit erst an einen Träger gebunden, worauf die Hybridisierung gegen die jeweils andere Sequenz in angemessener Zeit und bei Temperaturen von etwa 35 bis 70°C in 2xSSC Puffer, der 0,1% SDS enthält, durchgeführt

wird. Nachfolgend wird der Träger bei gleicher Temperatur mit einem Puffer reduzierter SSC Konzentration gewaschen. Abhängig von der erwünschten Stringenz und damit dem Grad der Ähnlichkeit der Sequenzen, sind solche Puffer im allgemeinen SSC Puffer mit einfacher Stärke, mit halber Stärke oder mit 1/10 Stärke (1xSSC, 0,5xSSC bzw. 0,1xSSC), enthaltend jeweils 0,1% SDS. Sequenzen mit höchstem Grad an Ähnlichkeit sind solche, deren Hybridisierung am wenigsten durch Waschen mit Puffer reduzierter Konzentration beeinflusst wird. Bevorzugt sind die Test- und die erfindungsgemäße Sequenz so ähnlich, dass die Hybridisierung durch Waschen mit oder Inkubieren in 0,1xSSC Puffer (0,1% SDS) im wesentlichen unbeeinflusst bleibt.

Von der Erfindung umfasst sind auch rekombinante Nucleotidsequenzen, die gegenüber den erfindungsgemäßen Sequenzen bezüglich eines oder mehrerer Codons modifiziert sind. Die Modifizierung erfolgt in einer Weise, dass die veränderten Codons der entsprechenden Aminosäure in jenem Organismus, in den die rekombinante Nucleotidsequenz eingebracht werden soll, begünstigt zur Translation benutzt werden. Die Expression der modifizierten DNA im besagten Organismus liefert im wesentlichen ähnliches Protein, wie die unmodifizierte, rekombinante Nucleotidsequenz in jenem Organismus, in welchem die proteincodierenden Komponenten der rekombinanten Nucleotidsequenz endogen sind.

Die Expression der erfindungsgemäßen Gene kann beispielsweise verbessert werden durch (i) Mutation der nicht-codierenden Region 5' des heterologen Gens zur Erhöhung der RNA Polymerase-Bindung, (ii) Benützung von Konstruktionen, die mehrere Promotor Regionen aufweisen, die entweder aus derselben Quelle oder aus einer anderen, beispielsweise aus einem GAPDH-Gen, stammen, (iii) Einbringen starker Promotor in das Genom (vorzugsweise nicht-zufällig) zur Veranlassung der Expression autologer oder heterologer Gene.

Beispiele für *Tolypocladium niveum* schließen *Tolypocladium niveum* ATCC 34921 und davon abgeleitete Stämme ein.

Die Alanin Racemase aus *Tolypocladium niveum* ist in der Literatur bisher nicht beschrieben worden. Um einen Zugang zu diesem Enzym zu finden, war es daher zunächst erforderlich, einen Aktivitätsnachweis zu entwickeln. Als Ausgangsbasis wurde die für prokaryontische Racemasen in der Literatur beschriebene NADH-Methode verwendet (Badet et al., 1984): das gebildete D-Alanin wird nachgewiesen, indem man es mit D-Aminosäureoxidase zu Pyruvat oxidiert; Pyruvat wird wiederum unter NADH-Verbrauch zu Lactat reduziert. Der Verbrauch

an NADH ist equimolar zum gebildeten D-Alanin und wird durch die Abnahme der UV-Absorption bei 340 nm bestimmt. In der Literatur ist dieser Assay in seiner "gekoppelten" Form beschrieben, das heißt, alle genannten Reaktionen (Epimerisierung des Alanins, Oxidation zu Pyruvat und Reduktion zu Lactat) werden simultan durchgeführt. Diese Methode hat in nur grob angereicherten Enzymextrakten aus *Tolypocladium niveum* nur unzuverlässige Meßwerte geliefert. Aus diesem Grund wurden die Reaktionen entkoppelt: im ersten Teilschritt wurde die Epimerisierung des L-Alanins zum D-Alanin durchgeführt, und nach Hitzeinaktivierung der Enzyme wurde das gebildete D-Alanin in einem zweiten Teilschritt zu Pyruvat und Lactat umgesetzt. Diese Entkopplung hat auch den Vorteil, daß die optimalen Bedingungen für die Epimerisierungsreaktion ohne Beeinflussung durch die nachfolgenden Reaktionen ermittelt werden können. Durch sorgfältige Optimierung der Reaktionsparameter (pH-Optimum, T-Optimum, Cofaktor-Bedarf, Oxidationsschutz) im ersten Teilschritt konnte damit eine hochempfindliche Nachweismethode für die Alanin Racemase aus *Tolypocladium niveum* etabliert werden, deren Prinzip (Entkopplung der Teilreaktionen) auch auf Alanin-Racemasen aus anderen Organismen angewendet werden kann. Als Enzymeinheit ist nach IUPAC-Nomenklatur jene Menge Protein definiert, die pro Minute 1 µmol L-Alanin zu D-Alanin epimerisiert.

Die Reinigung des Enzyms erfolgt nach üblichen Verfahren. Der Zellaufschluß kann aus feuchten oder lyophilisierten Zellen durchgeführt werden. Liegen die Zellen feucht vor, kann ein Druckaufschluß, z.B. mit einer Manton Gaulin Apparatur oder mit einer French Press, oder ein Aufschluß mit einer Glaskugelmühle durchgeführt werden. Lyophilisierte Zellen werden dagegen zweckmäßigerweise durch Zermörsern unter flüssigem Stickstoff aufgeschlossen. Im Fall der Alanin Racemase lag das Mycel in feuchtem Zustand und in großen Mengen vor, so daß ein Druckaufschluß mit einer Manton Gaulin Apparatur am zweckmäßigsten war.

Dem Aufschluß folgen eine grobe Klärung des Rohextrakts durch mitteltourige Zentrifugation (um 10.000 g) und ein weiterer Klärungsschritt durch Präzipitation von Nukleinsäuren. Zur Präzipitation der Nukleinsäuren können alle dafür üblichen Reagentien eingesetzt werden, wie z.B. Polyethylenimin oder Protaminsulfat. Die geeignete Konzentration sollte für jede Problemstellung neu erarbeitet werden. Für die Alanin Racemase wurde eine Endkonzentration von 0,1 % an Polyethylenimin eingesetzt.

Die Alanin Racemase kann aus einem derart geklärten Rohextrakt durch die üblichen

Methoden der Proteinreinigung angereichert werden. Als erste Stufe ist Aussalzen mit Ammoniumsulfat günstig, da dabei gleichzeitig das nach Mycel-Extraktion üblicherweise sehr große Volumen der Proteinlösung eingeengt werden kann. Im Anschluß daran können alle üblichen chromatografischen Verfahren zur Reinigung der Alanin Racemase herangezogen werden, wie z.B. Ionenaustausch-Chromatografie, Gelpermeations-Chromatografie, hydrophobe Interaktions-Chromatografie, Pseudoaffinitäts-Chromatografie an Farbstoff-Sepharosen, Chromatografie an anorganischen Trägermaterialien, wie z.B. Hydroxylapatit, und andere. Bei der Alanin Racemase kam nach der Ammoniumsulfatfällung als erstes ein Ionenaustauscherschritt an einer Säulenkombination aus S-Sepharose und Phosphozellulose zum Einsatz. Diese Kombination war deshalb günstig, da das Enzym unter gleichen Pufferbedingungen an S-Sepharose im Durchlauf war und an Phosphozellulose gebunden hat, obwohl beide Materialien vom Kationenaustauscher-Typ sind. Durch dieses Verhalten konnte ein sehr selektiver Reinigungseffekt erzielt werden. Im nächsten Schritt erfolgte eine Gelpermeations-Chromatografie an Sephacryl S300-HR. Als letzter Schritt erwies sich eine Anionenaustausch-Chromatografie an Mono-Q als besonders günstig, da an dieser Säule eine hohe Auflösung der Proteine erzielt werden kann, und die nach Gelpermeations-Chromatografie sehr verdünnte Probe hoch aufkonzentriert wird. Nach dieser Stufe war die spezifische Racemase-Aktivität gegenüber dem Rohextrakt etwa 1000fach angereichert. An Farbstoff-Sepharosen oder an Hydrophob-Materialien konnte ohne hohe Verluste keine weitere Aufreinigung der Alanin Racemase mehr erzielt werden. Nach Mono-Q ist die Enzympräparation jedoch bereits sauber genug, um der Enzymaktivität die entsprechende Proteinbande zuzuordnen. Man trifft eine erste Zuordnung, in dem man den Verlauf der Enzymaktivität in den nacheinander von Mono-Q eluierenden Fraktionen mit dem Auftreten der einzelnen Proteinbanden in einem SDS-PAGE korreliert. Obwohl eine solche Zuordnung in vielen Fällen, wie auch am Beispiel der Alanin Racemase, getroffen werden kann, ist es von Vorteil, wenn man versucht, die Proteinbande anhand ihrer Aktivität direkt zu identifizieren.

Im Fall der Alanin Racemase wurde dazu eine radioaktive, enzymspezifische Markierungstechnik angewendet. Es ist bekannt, daß Aminosäure Racemasen als essentiellen Cofaktor Pyridoxylphosphat benötigen. Dieses Pyridoxalphosphat ist in Abwesenheit eines adäquaten Enzymsubstrats über eine Schiff'sche Base an die epsilon-Aminogruppe eines Lysins im aktiven Zentrum des Enzyms gebunden. Durch Reduktion mit NaBH_4 läßt sich

diese Schiff'sche Base zu einem sekundären Amin und damit zu einer kovalenten Bindung zwischen Enzym und Cofaktor reduzieren. Verwendet man für diese Reaktion tritiiertes NaBH_4 , so führt man gleichzeitig eine radioaktive Markierung am Enzym ein, die nach SDS-PAGE und Trocknen des Gels durch Autoradiografie sichtbar gemacht werden kann. Mit dieser Methode lassen sich alle Pyridoxal-haltigen Enzyme nach entsprechender Anreicherung aus dem Rohextrakt eindeutig identifizieren, wie bereits für einige Racemasen publiziert wurde (Roise et al., 1984, Badet et al., 1984, Esaki und Walsh, 1986). Wie im Beispiel 3 beschrieben, ließ sich diese Methode auch auf die Alanin Racemase aus *Tolypocladium niveum* anwenden, was zur Identifizierung einer Proteinbande mit einer M_r von 39.000 führte. Das in der Erfindung entwickelte Reinigungsverfahren liefert eine etwa 10%ige Enzympräparation, in der die Racemase eindeutig identifiziert werden kann. Mit diesem Verfahren kann man aus ca. 5 kg Fermentationsbrei 4 mg Gesamtprotein gewinnen; der Anteil der Racemase beträgt demnach ca. 400 μg (2,5 Enzymeinheiten). Die Qualität dieser Präparation ist ausreichend, um alle wichtigen proteinchemischen Arbeiten, wie die Aminosäure-Sequenzierung, durchführen zu können.

Zur weiteren Charakterisierung der Alanin Racemase wurde die relative Molmasse des nativen Enzyms ermittelt. Durch Gelpermeations-Chromatografie wurde eine M_r um 100.000 ermittelt. Die durch solche Analysen erhaltenen Werte dürfen bekannterweise nur als Richtwerte betrachtet werden, da das Verhalten eines Proteins auf einem Molekularsieb nicht nur von seiner Größe, sondern auch von seiner (nicht bekannten) Gestalt, von seiner Hydrophobizität und von unspezifischen Wechselwirkungen mit der Gelmatrix abhängt. In Kombination mit der M_r des denaturierten Proteins von 39.000 ist es sehr wahrscheinlich, daß die Alanin Racemase als Homodimeres vorliegt, wie auch für eine Reihe anderer Racemasen beschrieben wurde (Inagaki et al., 1986, Inagaki et al., 1987, Wang und Walsh, 1978).

Die Aminosäure-Sequenzierung kann nach üblichen Methoden durchgeführt werden. Wenn das Enzym, wie im Fall der Alanin Racemase, nicht homogen vorliegt, werden die Proteine zweckmäßigerweise zuerst durch SDS-PAGE getrennt und an eine proteinbindende Membran gebロットet. Als erstes versucht man, eine N-terminale Sequenzierung durchzuführen. Wenn der N-Terminus, wie im Fall der Alanin Racemase, blockiert ist, oder auch, um interne Sequenzinformationen zu erhalten, kann man das Protein direkt an der Membran spalten: die Fragmente werden von der Membran eluiert, über HPLC aufgetrennt und der Gasphasen-Sequenzierung zugeführt.

Betreffend das GAPDH Gen wurde aus der chromosomalen DNA von *Tolypocladium niveum* eine DNA kloniert, die das Gen für die Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase, ein Enzym des zentralen Stoffwechselweges der Glykolyse, enthält. Das Gen samt seiner regulatorischen Region wurde in seiner Struktur analysiert und es zeigte sich, daß der Promotorbereich für die Konstruktion potenter Expressionsvektoren zum Beispiel für *Tolypocladium niveum* als Wirtstamm verwendet werden kann.

Bislang wurden schon einige Gene für die GAPDH einzelner niederer Eukaryonten kloniert und analysiert, wie etwa jene aus *Saccharomyces cerevisiae* (Holland and Holland, 1980), *Aspergillus nidulans* (Punt et al., 1988) oder *Cephalosporium acremonium* (Kimura et al., 1991). Das GAPDH-Gen aus *Tolypocladium niveum* und seine Verwendung für Techniken der genetischen Manipulation in diesem oder anderen Organismen wurde bis jetzt noch nicht beschrieben.

Das GAPDH-Strukturgen, die Initiationsstelle der Translation, der Promotor-aktive Teil, sowie der Transkriptions-Terminationsbereich des GAPDH-Gens kann aus Zellen von *Tolypocladium niveum* isoliert werden. Beispiele für *Tolypocladium niveum* schließen *Tolypocladium niveum* ATCC 34921 und davon abgeleitete Stämme ein.

Die DNA für das Alanin Racemase Gen, sowie auch für das GAPDH-Gen kann aus chromosomaler DNA von *Tolypocladium niveum* gewonnen werden. Die chromosomale DNA wiederum kann nach verschiedenen Methoden nach Stand der Technik isoliert werden, wie beispielsweise direkt aus aufgeschlossenen Zellen nach Kück et al. (1989) oder einem ähnlichen Verfahren. Eine andere Methode geht von Protoplasten aus. Dazu werden die Pilzzellen nach einer bekannten Methode protoplastiert, wie z.B. von Peberdy (1991) zusammengefaßt, bzw. nach einer entsprechenden Modifikation; sehr gut eignet sich die in Beispiel 18 beschriebene, optimierte Variante für *Tolypocladium niveum*. Nach Lyse der Protoplasten wird die DNA nach der Methode von Cryer et al. (1975) oder einer entsprechenden Modifikation isoliert und gereinigt (Beispiel 6).

Um die DNA, welche die Alanin Racemase Genregion der chromosomalen DNA bzw. jene DNA, die die GAPDH-Genregion enthält, zu detektieren und letztlich zu klonieren, kann irgendeine Methode verwendet werden, die die Existenz des Alanin Racemase Gens bzw. des GAPDH-Gens bestätigt. Zum Beispiel könnte prinzipiell eine Methode verwendet werden, die darauf beruht, einen entsprechenden Defekt im Wirtstamm Alanin Racemase Gen bzw.

GAPDH-Gen zu komplementieren. Eine andere Methode wäre, das Gen mittels Hybridisierung mit einem Teil oder einem ganzen bekannten Alanin Racemase Gen bzw. GAPDH-Gen aus einem anderen Organismus nachzuweisen. Mögliche andere Mikroorganismen betreffend das Alanin Racemase Gen wären beispielweise *Salmonella typhimurium* (Wasserman et al., 1984 (*dadB*), Galakatos et al., 1986 (*alr*)), *Bacillus stearothermophilus* (Inagaki et al., 1986, Tanizawa et al., 1988) oder *Bacillus subtilis* (Ferrari et al., 1985). Da es sich dabei jedoch um prokaryontische Gene handelt, und in diesem Fall keine ausgeprägte Homologie erwartet werden kann, ist es essentiell, zunächst Aminosäure-Teilsequenzen des Alanin Racemase Proteins aus *Tolypocladium niveum* zu bestimmen, und sich dann daraus geeignete spezifische Oligonukleotidsonden abzuleiten und herzustellen. Geeignete andere Mikroorganismen betreffend das GAPDH-Gen sind beispielweise *Saccharomyces cerevisiae* oder *Aspergillus nidulans*. Im speziellen Fall kann ein Teil des GAPDH-Gens aus *Penicillium chrysogenum* eine brauchbare Probe sein.

Als Wirtstamm für eine Klonierung wird üblicherweise *Escherichia coli* genutzt, obwohl natürlich auch andere Organismen verwendet werden könnten. Ein bevorzugter Stamm ist etwa der kommerziell erhältliche *Escherichia coli* SRB (Fa.Stratagene). Als Kloniervektor kann prinzipiell jeder Vektor verwendet werden, der in *Escherichia coli* transferiert werden kann. Meist werden Plasmidvektoren, wie zum Beispiel pBR322, pUC18, pUC19, pUCBM20, pBluescriptII SK+ und dergleichen, oder Vektoren auf der Basis des Bakteriophagen Lambda, wie etwa Lambda EMBL3, oder Lambda DASH II, verwendet. Um noch größere DNA-Fragmente zu klonieren, können Cosmide verwendet werden, beispielsweise der Vektor Supercos 1 (Fa.Stratagene).

Um Fragmente der isolierten chromosomalen DNA in einen Vektor zu inserieren, kann die chromosomale DNA mit einem geeigneten Restriktionsenzym entweder partiell oder vollständig geschnitten werden. Ebenso kann der ausgewählte Vektor mit dem selben Restriktionsenzym oder einem, das gleiche Enden erzeugt, geschnitten werden. Im Falle von Lambda- oder Cosmid-Vektoren können dazu die beiden Randfragmente nach einer bekannten Methode hergestellt werden, um die Kloniereffizienz zu erhöhen. Dann können DNA-Fragmente und Vektor mittels einer DNA-Ligase miteinander ligiert werden, um die entsprechenden rekombinanten DNA-Moleküle zu erhalten.

Die rekombinierte DNA wird dann in *Escherichia coli* eingebracht. Im Fall eines Plasmidvektors kann das mittels "kompetenter Zellen" (Sambrook et al., 1989) oder durch

Elektrotransformation durchgeführt werden. Lambda- und Cosmid-Moleküle werden durch *in vitro* Verpackung in Bakteriophagen Lambda Phagen-Hüllen und anschließende Infektion des entsprechenden Wirtstammes in *Escherichia coli* eingebracht. Für die *in vitro* Verpackung können kommerziell erhältliche Lysate herangezogen werden (z.B. Gigapack II, Fa.Stratagene).

Um unter den rekombinanten Klonen jene mit dem Alanin Racemase-Gen bzw. jene, mit dem GAPDH-Gen zu detektieren, werden Plaque-Hybridisierungen für Lambda-Klone, bzw. Kolonie-Hybridisierungen für Plasmid- und Cosmid-Klone nach Standardtechniken durchgeführt (Sambrook et al., 1989), wobei als Sonde für das Alanin Racemase Gen ein Oligonukleotidgemisch, das wie oben beschrieben aus Aminosäure-Teilsequenzen des Alanin Racemase Proteins abgeleitet wurde, herangezogen wird. Dabei muß in Vorversuchen zunächst ein geeignetes Gemisch ausgewählt werden, und die Stringenz der entsprechenden Hybridisierung in Southern-Experimenten sehr gut optimiert werden. Durch mehrmaliges Wiederholen der Plaquehybridisierung kann eine entsprechende DNA, die das Alanin Racemase Gen aus *Tolypocladium niveum* enthält, rein isoliert werden. Als Sonde für das GAPDH-Gen kann ein Teil des GAPDH-Gens aus *Penicillium chrysogenum* herangezogen werden, wobei die Stringenz entsprechend modifiziert werden muß. Durch mehrmaliges Wiederholen dieser Technik kann eine entsprechende DNA, die das GAPDH-Gen aus *Tolypocladium niveum* enthält, rein isoliert werden.

Nach Restriktionsanalysen der entsprechenden DNA können einzelne Fragmente in Plasmid- oder Bakteriophagen M13-Vektoren mittels Standardtechniken subkloniert werden. Durch ein Sequenzierverfahren (z.B. nach Maxam-Gilbert (Maxam und Gilbert 1980) oder die Dideoxy-Methode (Sanger et al., 1977) bzw. einer geeigneten Modifikation) kann die Nukleotidsequenz des Alanin Racemase Gens bzw. des GAPDH-Gens bestimmt werden.

Nach Analyse der Sequenz und Vergleich der translatierten Sequenz mit den Aminosäureteilsequenzen der identifizierten Alanin Racemase kann verifiziert werden, daß es sich um das Alanin Racemase Gen handelt, und auch die Orientierung des Gens, sowie dessen Promotor- und Terminations-Region auf der DNA kann bestimmt werden. Durch Northernhybridisierungen entsprechender Teilfragmente des Alanin Racemase Gens bzw. des GAPDH-Gens kann die Expression des hybridisierten Gens bestätigt werden.

Nach Analyse der entsprechenden Sequenzen, sowohl im Falle des Alanin Racemase Gens, als auch des GAPDH-Gens, können die Lage des Strukturgens, des Promotors, sowie der

Terminationsregion bestimmt werden. Dies kann wesentlich untermauert werden, wenn neben dem genomischen DNA-Fragment auch die entsprechende RNA in Form von cDNA für die Untersuchungen herangezogen wird. Darüberhinaus wird auch die Bestimmung der Lage von Intron-Bereichen und des Startpunktes der Transkription erleichtert. Dazu wird zunächst die gesamte RNA aus den Pilzzellen nach der von Cathala et al. (1983) beschriebenen, oder einer ähnlichen Methode isoliert. Nach einem der zahlreichen Standardverfahren wird daraus die polyA-RNA gereinigt. Die Überschreibung in c-DNA kann zum Beispiel durch PCR-Amplifikationstechnik realisiert werden. Anschliessend werden durch RACE ("rapid amplification of cDNA ends") unter Verwendung kommerziell erhältlicher Systeme (z. B. Fa. GIBCO BRL, Fa. Clontech) und unter Einsatz genspezifischer Oligonukleotidprimer sowohl der Anfang der Transkripte (5'-RACE), als auch das Ende (3'-RACE), beziehungsweise dadurch auch der interne Genbereich (Prüfung auf Introns) isoliert und zur direkten Sequenzierung oder zur Sequenzierung nach entsprechender Klonkonstruktion zugänglich. Dieses Vorgehen wurde zur Charakterisierung des Alanin Racemase Gens im Beispiel 27 dargestellt, wobei der genaue Transskriptionsstart, die Transkriptionsdetermination und die Lage von Intronbereichen lokalisiert wurde. Eine andere Möglichkeit ist, die nach Überschreibung der poly-RNA erhaltene cDNA unter Einsatz geeigneter Linker oder Adaptoren in Plasmid- oder Lambda-Vektoren einzubauen. Die Suche und Reinigung der positiven Klone erfolgt analog zu oben mittels Plaque- bzw. Kolonie-Hybridisierungen, wobei nun zweckmäßigerweise auch ein Teil des GAPDH-Gens aus *Tolypocladium niveum* verwendet werden kann. Der Anteil an positiven Klonen im Vergleich zur Gesamtzahl an untersuchten Klonen gibt dabei auch einen Anhaltspunkt über die Stärke der Expression des gesuchten Gens unter den entsprechenden Bedingungen. Im Fall des GAPDH-Gens gemäss Beispiel 13 war der Anteil an positiven Klonen mit ca. 2.5 bis 3 % sehr hoch. Nach Sequenzierung geeigneter cDNA-Fragmente des GAPDH-Gens können durch Vergleich mit der genomischen Sequenz exakt die Lage der Introns, sowie der Promotor- und der Terminations-Bereich lokalisiert werden.

In Abbildung 15 ist die Nukleotidsequenz des GAPDH-Gens, das aus *Tolypocladium niveum* gemäss der Beispiele 12, 13 und 14 isoliert wurde, dargestellt. Das ATG-Codon bei Pos. 673 der Abbildung 15 ist das Startcodon der Translation, der Beginn des eigentlichen Strukturgens. Im nicht translatierten Bereich oberhalb des Transkriptionsstarts können Strukturelemente gefunden werden, wie sie schon in ähnlicher Form in anderen

Pilzpromotoren gefunden wurden. So etwa schließt sich eine ca. 60 bp lange CT-Region oberhalb des vermutlichen Transkriptionsstarts an, welche in einer potentiellen TATA-Box endet. Weitere etwa 60 bp aufwärts könnte eine sogenannte CAAT-Box lokalisiert werden (Gurr et al., 1987).

Es können nun entsprechende DNA-Fragmente, die diesen Promotorbereich enthalten, für die Konstruktion einzelner Fusionen mit Genen, die unter die Kontrolle des GAPDH-Gen Promotors gestellt werden sollen, verwendet werden. Zur Konstruktion der Vektoren in denen Fusionen des GAPDH-Gen Promotors zum Hygromycin-Resistenzgen enthalten sind, wurden gemäss der Beispiele 20 und 26 bestimmte Teile des sequenzierten Bereiches verwendet. Dies sind jedoch nur einzelne Möglichkeiten für solche Konstruktionen. So kann beispielsweise auch ein Teil der DNA deletiert werden, sowohl am 5'-Ende des Bereiches, als auch am 3'-Ende. Es können auch nur Teile des Promotorbereiches Verwendung finden (wie in Beispiel 25), etwa nur der Teil bis zum Startpunkt der Transkription. Andererseits können aber auch größere Teile des Strukturgens für solche Fusionen mit herangezogen werden. Analog verhält es sich natürlich auch mit dem verwendeten Fragment aus dem Terminationsbereich des Gens. Darüberhinaus kann auch eventuell ein kleiner Teil der Promotor- und Terminator-Fragmente für spezielle Zwecke modifiziert werden, beispielsweise um die Expression weiter zu steigern. Mit Hilfe solcher DNA-Fragmente können Gene, deren Expression man erreichen will, zu Fusionskonstruktionen kombiniert werden. Beispiele für diese Gene können etwa solche, die als Selektionsmarken im entsprechenden Organismus dienen, wie in den Beispielen 20 und 25 beschrieben, oder irgendwelche andere Gene, die für spezielle Enzyme codieren, sein. Ganz allgemein kann dieses Gen sowohl aus genomischer DNA, aus cDNA, die aus mRNAs gebildet wurde, chemisch synthetisiert oder semisynthetisch hergestellt sein.

Essentielle Voraussetzungen zur gezielten Veränderung von *Tolypocladium niveum* sind entsprechende Verfahren zur Protoplastierung und Transformation. Als Wirtsstämme für die einzelnen Genkonstruktionen können irgendwelche Stämme der Art *Tolypocladium niveum*, aber auch andere Pilzarten Verwendung finden. Als Verfahren, um diese Genkonstruktionen in *Tolypocladium niveum* zu bringen, kann neben der Transformation von Protoplasten (wie etwa im Beispiel 19 beschrieben), aber auch eine andere Methode (z.B. Elektrottransformation von Protoplasten oder sphäroplastiertem Mycel, o.ä.) herangezogen werden. Die Transformation kann direkt erfolgen, indem sich die Genkonstruktion auf einer Vektor-DNA

zusammen mit einer geeigneten Selektionsmarke befindet, oder aber mittels Cotransformation durchgeführt werden. Hierbei wird neben geeigneter Vektor-DNA jene Genkonstruktion, die sich auf einer anderen DNA befindet, dem Transformationsansatz beigelegt. Entsprechende Transformanten können durch verschiedene Hybridisierungstechniken molekular analysiert werden.

Gemäss der obigen Beschreibung ist es also möglich, *Tolypocladium niveum* mit DNA, die das Gen für die Alanin Racemase oder die das Gen oder einen Teil davon für das GAPDH-Gen trägt, zu transformieren. In Southernhybridisierungen lassen sich Stämme finden, die mehrere zusätzliche Kopien des Alanin Racemase Gens enthalten. Dabei läßt die Anzahl der Kopien allein keinen zwingenden Schluß auf Mehrleistung der Stämme zu, da die Integrationsorte und veränderte Regulationsmechanismen einen wesentlichen Einfluß besitzen. In Testfermentationen können diese Stämme untersucht werden, und dann dabei solche gefunden werden, die mehr Cyclosporin A bilden.

Durch Transformation von *Tolypocladium niveum* mit Plasmidvektoren, die einen Teil des Alanin Racemase Gens (der nicht zur Ausbildung des aktiven Enzyms ausreicht) tragen, können Stämme erzeugt werden, die den Plasmidvektor in das genomische Alanin Racemase Gen durch homologe Rekombination integriert haben, wodurch das Gen zerstört worden ist. In Testfermentationen kann gezeigt werden, daß diese Stämme kein Cyclosporin A mehr bilden. Dies ist auch ein weiterer Beweis, daß es sich beim klonierten Gen tatsächlich um das Gen für das Enzym Alanin Racemase handelt, welches für die Cyclosporinbiosynthese essentiell ist.

Da die Biosynthese des Cyclosporins an der Position 8, also mit Aktivierung des D-Alanins, startet, sind Stämme, in denen das Alanin Racemase Gen zerstört wurde, besonders interessant für den Einbau "fremder" Aminosäuren an der Position 8 im Cyclosporinmolekül. Es wurde insbesondere gefunden, dass eine Nucleotid-Sequenz, die gegenüber der in der Abbildung 5 angegebenen Sequenz in Position 2318 ein A (Adenosin) anstatt des G (Guanosins) besitzt, wodurch das Triplet in den Positionen 2317, 2318, und 2319 für Asparaginsäure anstatt für Glycin codiert, zu einem Einbau von D-Serin anstatt von D-Alanin in Position 8 des Cyclosporins führt. Durch Zugabe größerer Mengen "fremder" Aminosäuren ins Fermentationsmedium können Stämme gefunden werden, die deutliche Mengen an modifizierten Cyclosporinen bilden können.

Cyclosporine, die in 8-Stellung eine andere Aminosäure, als D-Alanin tragen und die gemäss vorliegender Erfindung herstellbar sind, sind beispielsweise im US-Patent 5,284,826 geoffenbart und zitiert, deren Inhalt hiermit als Referenz eingefügt wird. Diese modifizierten Cyclosporine finden in den dort geoffenbarten und zitierten Anwendungsgebieten als Pharmazeutika Verwendung und sind auf die dort angegebene und zitierte Art und Weise und in den dort angegebenen und zitierten Dosen anwendbar.

Die folgenden Beispiele und Abbildungen erläutern die Erfindung, ohne sie jedoch zu beschränken.

Die in den Abbildungen 1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 12, 17, 18 und 19 gezeigten Restriktionskarten sind zum Teil nur ungefähre Wiedergaben von Restriktionsschnittstellen in den DNA-Molekülen. Die gezeichneten Abstände sind proportional zu den tatsächlichen Abständen, letztere können sich jedoch davon unterscheiden. Nicht alle Restriktionsschnittstellen sind wiedergegeben, es können durchaus weitere Schnittstellen vorhanden sein.

Abbildung 1: Restriktionskarte des ca. 15.2 kb großen Anteils genomischer DNA von *Tolypocladium niveum* in Lambda RAC4 (weißer Balken). Der schattierte Balken repräsentiert das ca. 1100 bp große *Pst*I Restriktionsfragment, das mit der Hybridisierungs-sonde (Oligonukleotidgemisch R14) ein positives Signal liefert und in pRP1 kloniert wurde. Die beiden schraffierten Balken stellen jene benachbarten Fragmente dar, die in pRP6, bzw. pRP9 subkloniert wurden.

Abbildung 2: Restriktionskarte des Plasmids pRP1. Der schattierte Balken repräsentiert das ca. 1100 bp große *Pst*I Restriktionsfragment, das mit der Hybridisierungs-sonde (Oligonukleotidgemisch R14) ein positives Signal lieferte. Der dünnere Anteil stellt den Bereich des verwendeten Plasmidvektors pUCBM20 dar.

Abbildung 3: Restriktionskarte des Plasmids pRP6. Der schattierte Balken repräsentiert das ca. 1.9 kb große *Eco*RI-*Sa*I Restriktionsfragment aus Lambda RAC4. Der dünnere Anteil stellt den Bereich des verwendeten Plasmidvektors pUCBM20 dar.

Abbildung 4: Restriktionskarte des Plasmids pRP9. Der schattierte Balken repräsentiert das ca. 650 bp große *Hind*III-*Pst*I Restriktionsfragment aus Lambda RAC4. Der dünnere Anteil stellt den Bereich des verwendeten Plasmidvektors pBluescriptII SK+ dar.

Abbildung 5: Nukleotidsequenz des ca. 1,1 kb große *Pst*I-Insert in pRP1, des ca. 1,9

kb grosse *EcoRI*-*Sall*-Fragment aus pRP6, des ca. 650 bp grossen *PstI*-*HindIII*-Fragment aus pRP9, sowie noch zusätzlich 511 bp anschliessend an die *HindIII*-Stelle umfassend 3973 Nukleotide (siehe auch Abbildung 19). Einzelne Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen sind angegeben.

Abbildung 6: Restriktionskarte eines sequenzierten Teilbereiches aus Abbildung 5. Die Lage der aufgefundenen Aminosäureteilsequenzen (Beispiel 12) ist angegeben.

Abbildung 7: Restriktionskarte des Plasmids pRP12. Der schattierte Balken repräsentiert das ca. 835 bp große *EcoRI*-*PstI* Restriktionsfragment aus pRP1. Der dünnere Anteil stellt den Bereich des verwendeten Plasmidvektors pUCBM20 dar.

Abbildung 8: Restriktionskarte des Plasmids pGT24. Das Plasmid leitet sich aus pGT14 ab und enthält ein *Bam*HI-Fragment (weißer Balken) mit dem Hygromycinresistenzgen, dessen Orientierung durch den punktierten Pfeil gekennzeichnet ist.

Abbildung 9: Restriktionskarte des Plasmids pGT1. Der schattierte Balken repräsentiert das in Beispiel 12 isolierte *SacI*-Fragment mit dem GAPDH-Gen aus *Tolypocladium niveum*. Der dünnere Anteil stellt den Bereich des verwendeten Plasmidvektors pUC18 dar.

Abbildung 10: Nukleotidsequenz des 2271 bp großen *SacI*-Fragmentes aus pGT1

Abbildung 11: Restriktionskarte des Plasmids pGT4. Der schattierte Bereich stellt die klonierte cDNA des GAPDH-Gens (*gpdA*) (Beispiel 13) dar. Der dünnere Bereich steht für den Anteil des Plasmidvektors pUCBM20.

Abbildung 12: Nukleotidsequenz des 1347 bp großen cDNA-Inserts in pGT4. Die Pos. 1 - 14 und 1334 - 1347 (unterstrichen) entsprechen den für die Klonierung verwendeten Adaptormolekülen und enthalten die Erkennungsstellen für die Restriktionsendonukleasen *EcoRI* (GAATTC) und *NotI* (GCGGCCGC).

Abbildung 13: Nukleotidsequenz des 1278 bp großen *XhoI*-*Sall* Fragmentes aus *gpdA*, das den Promotor des GAPDH-Gens enthält (Beispiel 14). Die *SacI*-Erkennungsstelle entspricht jener bei Pos. 1-6 in Abbildung 11.

Abbildung 14: Vergleich der genomischen Nukleotidsequenz (oben), mit jener der cDNA (unten) (Beispiel 14). Einzelne Restriktionsschnittstellen sind gekennzeichnet. Die beiden Intron-Bereiche sind durch den Strich dargestellt. Das Translationsstartcodon ATG, ebenso wie das Translationsstoppcodon TAA, ist unterstrichen. Sie markieren die Lage des eigentlichen GAPDH-Strukturgens aus *Tolypocladium niveum*.

Abbildung 15: Aminosäuresequenz der abgeleiteten GAPDH

Abbildung 16: Restriktionskarte des Plasmids pGT12 (Beispiel 20). Der graue Pfeil markiert den Bereich und die Orientierung des gewählten Promotorfragmentes des GAPDH-Gens aus *Tolypocladium niveum*. Der dünne Bereich entspricht dem Teil des verwendeten Plasmidvektors pBluescript II SK+.

Abbildung 17: Restriktionskarte des Plasmids pGT14 (Beispiel 20). Die grauen Bereiche kennzeichnen das verwendete Promotorfragment (Pfeil) und das Fragment aus dem Terminatorbereich des GAPDH-Gens aus *Tolypocladium niveum*.

Abbildung 18: Restriktionskarte des Plasmids pGT30 (Beispiel 26). Der graue Pfeil markiert den Bereich und die Orientierung des gewählten Promotorfragmentes des GAPDH-Gens aus *Tolypocladium niveum*. Das durch den weißen Balken markierte Fragment enthält das Hygromycinresistenzgen, dessen Orientierung durch den punktierten Pfeil gekennzeichnet ist. Der Rest des Plasmides entspricht pCSN44 (Staben et al., 1989)

Abbildung 19: Die aus der Nucleotidsequenz abgeleitete Aminosäuresequenz der Alanin Racemase aus *Tolypocladium niveum*

Abbildung 20: Nucleotid Sequenz des 3973 bp grossen Alanin Racemase Gen - Bereiches. Der kodierende Bereich des Strukturgens ist durch Darstellung der Aminosäuresequenz gekennzeichnet. Die Lage des Introns ist markiert.

Abbildung 21: Ergebnis der Sequenzierung von 32 5'-RACE Klonen des Alanin Racemase Gens. Startnucleotid ist jeweils das gross dargestellte A. Identische Sequenzbereiche sind durch Striche markiert. Die Positionsnummern beziehen sich auf das A des Translationsstartcodons.

Abbildung 22: Ergebnis der Sequenzierung von 12 3'-RACE Klonen des Alanin Racemase Gens. Oberhalb der Enden der einzelnen DNAs ist die genomische Sequenz als Bezugspunkt kursiv dargestellt. Die Positionsnummern beziehen sich auf das A des Translationsstartcodons. Die Zahl hinter dem "/" steht für die Länge des 3'-Bereiches nach dem Stoppcodon.

Beispiel 1: Analytische Bestimmung der Alanin Racemase-Aktivität:

1. Stufe: Racemase-Reaktion:

Etwa 1 mU Racemase werden in einem Gesamtvolumen von 120 μ l unter Anwesenheit von 30 mM L-Alanin, 50 μ M Pyridoxalphosphat (Boehringer Mannheim), 20 mM DTT und 100 mM Tricin pH 8,5 1 Stunde bei 48°C inkubiert. Danach wird die Proteinlösung durch 5 Minuten Erhitzen auf 80°C inaktiviert; die denaturierten Proteine werden in der Eppendorffzentrifuge abzentrifugiert.

2. Stufe: Nachweis des gebildeten D-Alanins durch Reaktion mit D-Aminosäure-Oxidase (DAO) und Lactat-Dehydrogenase (LDH) (beide Enzyme von Boehringer Mannheim):

100 μ l Überstand aus der hitzeinaktivierten Racemase-Reaktion werden in einem Gesamtvolumen von 500 μ l unter Anwesenheit von 200 μ M NADH (Boehringer Mannheim), 0,3 units DAO, 1 unit LDH und 100 mM Tricin pH 8,5 bei 30°C gemessen. Die Durchführung erfolgt in 500 μ l Quarz-Küvetten (Quarzglas Suprasil Mikroküvetten), und der durch den NADH-Verbrauch bewirkte Extinktionsabfall wird 20 Minuten bei 340 nm gemessen.

Bestimmung der Enzymeinheiten (enzyme units): Nach IUPAC-Nomenklatur ist ein Racemase-unit als 1 μ mol D-Alanin, welches pro Minute gebildet wird, definiert. Die Bildung von D-Alanin ist equimolar zum Verbrauch an NADH.

Beispiel 2: Anreicherung der Alanin Racemase:

Mit dem folgenden Protokoll lassen sich aus 1 kg feuchtem Mycel (feucht nach Abschleudern, wie unten beschrieben) ca. 4 mg Gesamtprotein gewinnen, woran die Alanin Racemase einen Anteil von etwa 10% (ca. 0,4 mg) hat. Diese 0,4 mg Alanin Racemase besitzen eine Aktivität von 2,5 Enzymeinheiten, was einer 1000-fachen Anreicherung der Enzymaktivität, bezogen auf den Rohextrakt, entspricht.

Alle Schritte wurden zwischen 0°C und 4°C durchgeführt. Alle säulenchromatografischen

Trennungen wurden an einer FPLC-Anlage (von Pharmacia) durchgeführt.

1. Schritt: Ernte und Aufschluß des Mycels:

4-5 kg Fermentationsbrei wurden bei 16.000 g, 10 Minuten, abzentrifugiert. Der Brei wurde zweimal mit 2,5 l physiologischer Kochsalzlösung unter Zusatz von 5 mM EDTA gewaschen. 1 kg der so gewonnenen, feuchten Biomasse wurde in 2,5 l Puffer A (0,25 M HEPES pH 7,5; 0,4 M KCl; 5 mM EDTA; 20 gv% Glycerin; 10 mM DTT) suspendiert und mit Hilfe eines Ultraturrax homogenisiert. Die Suspension wurde im Manton Gaulin Lab 60 unter 3 Durchläufen zu je 600 bar aufgeschlossen (Durchflußgeschwindigkeit 60 l/h). Die Temperatur wurde zwischendurch immer wieder auf 4°C gestellt. Die Zelltrümmer wurden in einer mitteltourigen Standzentrifuge 10 Minuten bei 16.000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde als Rohextrakt bezeichnet.

2. Schritt: Entfernung der Nukleinsäuren aus dem Rohextrakt:

Die Nukleinsäuren wurden durch Zugabe einer Polyethyleniminlösung (12% in Wasser; dialysiert zur Entfernung der niedermolekularen Bestandteile) zu einer Endkonzentration von 0,1% ausgefällt. Der Niederschlag wurde durch 10 Minuten Zentrifugation bei 17.000 g entfernt. Dieser geklärte Rohextrakt wurde als Polyethylenimin-Überstand bezeichnet.

3. Schritt: Proteinfällung mit Ammoniumsulfat:

Der Polyethylenimin-Überstand wurde durch Zutropfen einer 100% gesättigten Ammoniumsulfat-Lösung in Puffer B (0,1 M HEPES pH 7,5; 4 mM EDTA; 15 gv% Glycerin; 4 mM DTT) auf 40% Sättigung an Ammoniumsulfat gestellt. Nach beendeter Zugabe wurde 30 Minuten nachgerührt. Das Proteinpellet wurde 30 Minuten bei 32.000 g abzentrifugiert, danach ad 500 ml in Puffer B gelöst und 12 Stunden gegen 5 l Puffer B dialysiert. Das Dialysat wurde vor dem 4. Schritt mit Puffer B auf das doppelte Volumen verdünnt und über einen 8 µ Glasfaserfilter filtriert. Die so erhaltene Probe wurde als Ammoniumsulfatfraktion bezeichnet.

4. Schritt: Kombinationschromatografie an den Kationenaustauschern S-Sepharose und Phosphozellulose P11:

Zwei Säulen (S-Sepharose fast flow war von Pharmacia: 2,6 x 7,8 cm und Phosphozellulose P11 war von Whatman: 5 x 7,9 cm) waren in tandem geschaltet, und zwar derart, daß die Proteine beim Auftrag zuerst über S-Sepharose filtriert und danach an Phosphozellulose gebunden wurden. Dieser Teil der Chromatografie erfolgte in Puffer B mit einer Flußrate von 10 ml/min. Die gekoppelten Säulen wurden solange mit Puffer B gewaschen, bis die Extinktion auf die Basislinie zurückgefallen war. Danach wurde die S-Sepharose entkoppelt und die Phosphozellulose mit einem Salzgradienten eluiert: Gradient in 700 ml auf Puffer C (= Puffer B mit 1 M NaCl). Flußrate: 5 ml/min. Die aktiven Fraktionen wurden gepoolt und über einen 0,8 µ Membranfilter filtriert. Diese Probe wurde als P11-Pool bezeichnet.

5. Schritt: Aufkonzentrierung des P11-Pools durch Ultrafiltration:

Der P11-Pool wurde über eine Membran mit einer Trenngrenze bei einer M_r von 30.000 (YM30 von Amicon) auf 10 ml eingengt. Bedingungen: Ultrafiltrationszelle von Amicon, unter N_2 -Begasung, maximal 5 bar, bei 4°C.

6. Schritt: Gelpermeations-Chromatografie an Sephacryl S300-HR:

Sephacryl S300-HR war von Pharmacia: 2,6 x 95 cm. Die Säule wurde in Puffer D (50 mM Tris/HCl pH 8,2; 1 mM EDTA; 10 gv% Glycerin; 4 mM DTT) unter Zusatz von 0,2 M NaCl equilibriert. Die Kalibrierung erfolgte unter gleichen Pufferbedingungen mit einem BioRad GPC-Standard. Chromatografie: Flußrate 1 ml/min. Die Aktivität eluierte bei einem Volumen von 268-302 ml. Die so erhaltene Probe wurde als S300-Pool bezeichnet.

7. Schritt: Anionenaustauschchromatografie an Mono-Q:

Die MonoQ-Säule HR5/5 war von Pharmacia und in Puffer D equilibriert. Der S300-Pool wurde über Mono-Q in 2 Portionen gereinigt. Die Probe wurde jeweils nach Dialyse gegen Puffer D bei einer Flußrate von 0,5 ml/min aufgetragen. Die Elution der gebundenen Proteine

erfolgte mit einem Gradienten: von 0 auf 20% Puffer E (= Puffer D mit 1 M NaCl) in 2 ml; von 20 auf 70% E in 15 ml und von 70 auf 100% E in weiteren 3 ml, bei einer Flußrate von 0,2 ml/min. Der Hauptpeak der Racemase-Aktivität lag bei 0,32 bis 0,36 M NaCl.

Beispiel 3: Identifizierung der Proteinbande im SDS-PAGE:

Zur korrekten Identifizierung der mit der Racemase-Aktivität korrelierenden Proteinbande wurde eine radioaktive enzyspezifische Markierungstechnik angewendet. Die Racemase-haltigen Proteinlösungen nach dem letzten Reinigungsschritt an Mono-Q (0,2 mg Gesamtprotein in 200 µl) wurden vor der Markierung gegen 20 mM KH_2PO_4 -Puffer pH 7 etwa 10 Stunden dialysiert. Die Reduktion wurde in einem Gesamtvolumen von 300 µl mit 2 µl einer 10 mg/ml NaBH_4 -Lösung in 0,2% NaOH und 3,7 MBq $[\text{^3H}]\text{-NaBH}_4$ (spez. Aktivität: 331 GBq/mmol; von NEN), ebenfalls in 0,2% NaOH bei Raumtemperatur drei Stunden durchgeführt. Danach wurden die Ansätze 12 Stunden gegen 100 mM NH_4HCO_3 unter mehrmaligem Pufferwechsel dialysiert und im Vakuum zur Trockne eingengt. Die Pellets wurden in 50 µl Probenpuffer für SDS-PAGE aufgenommen und 5 Minuten gekocht. Die Elektrophorese wurde nach Lämmli (Lämmli 1970) in einem 10% Gel mit anschließender Coomassie Blue-Färbung durchgeführt. Danach wurde das Gel 30 Minuten fixiert (in 25% Isopropanol, 10% Essigsäure, 2% Glycerin) und anschließend 15 Minuten in Amplify-Lösung (von Amersham; mit Zusatz von 2% Glycerin) geschwenkt. Das Gel wurde getrocknet und an einem HyperfilmTM-MP (Amersham) bei -70°C zwei bis vier Wochen exponiert. Durch diese Methode konnte die Racemase-Aktivität eindeutig einer Proteinbande mit einer M_r von 39.000 zugeordnet werden.

Beispiel 4: Molekulargewichtsanalyse der Alanin-Racemase:

Die M_r -Analyse wurde an einer TSK-3000-SWG 21,5 x 600 mm, mit einer TSK-SWG 21,5 x 75 mm Vorsäule, an einer HPLC-Anlage durchgeführt. Puffer: 0,2 M Tris/HCl pH 7,5; Flußrate: 5 ml/min. Die Kalibrierung der Gelsäule erfolgte mit den Eichproteinen Aldolase (M_r 160.000), IgG (150.000), alkalische Phosphatase (140.000), BSA (68.000), Ovalbumin (45.000), Carboanhydrase (30.000) und Myoglobulin (18.800). Es wurde eine M_r um 100.000 ermittelt.

Beispiel 5: Aminosäure-Sequenzen der Alanin Racemase:

Die Proteinprobe wurde einer SDS-PAGE (10%) in einem Mini Protean II Elektrophorese System (Bio Rad) unterworfen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel 5 Minuten in Transfer Puffer (10 mM CAPS (3-(Cyclohexylamino)-1-propane sulfonic acid, Fluka), 10% Methanol, pH 11.0 mit Natronlauge eingestellt) equilibriert. Eine PVDF (Polyvinylidene difluoride) Membran (Immobilon, Millipore) wurde 5 Sekunden in Methanol getaucht und anschließend ebenfalls in Transfer Puffer equilibriert. Danach wurden die Proteine in der Mini Trans-Blot Zelle (Bio Rad) innerhalb einer Stunde bei 200 mA vom Gel auf die Membran transferiert. Nach dem Transfer wurde die Membran 5 Minuten in Wasser gewaschen, danach in einer 0.1% Lösung von Coomassie Blue R-250 (Serva) in 50% Methanol 2 Minuten gefärbt und in 50% Methanol, 10% Essigsäure entfärbt, bis sich die Proteinbanden klar identifizieren ließen. Die Membran wurde anschließend mit Wasser gewaschen, die Alanin Racemase enthaltenden Banden (aufgrund der Färbung geschätzte Alanin Racemase Menge: 25 µg) ausgeschnitten und in Quadrate von ca. 1 mm Seitenlänge zerkleinert, die in 1 ml einer 0.2% PVP-40 (Polyvinylpyrrolidone (Sigma) Lösung in 100% Methanol gegeben wurden. Nach Inkubation von einer Stunde bei 37°C und Waschen in Wasser wurden die Membranstücke in 100 mM Tris.HCl Puffer, pH 8.1 gegeben.

Nach Zugabe von 2 µg der Protease Lys-C (Boehringer Mannheim) wurde bei 37°C inkubiert. Nach 20 Stunden Inkubation wurde festes Guanidin.HCl bis zu einer Endkonzentration von 6 M zugegeben. Durch Zugabe von 300 µg DTT und 90 Minuten Inkubation bei 37°C unter Argon wurde das Protein reduziert und anschließend durch Zugabe eines 3fachen molaren Überschusses über DTT von Iodacetamid unter Argon während 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln alkylt. Das durch den Abbau mit Lys-C entstandene, reduzierte und alkyltierte Peptidgemisch wurde auf eine 2.1 x 30 mm reversed phase Säule (Aquapore RP-300, 7 µm, Brownlee) aufgetragen und in einem Modell 130A HPLC System von Applied Biosystems aufgetrennt. Die Auftrennung der Peptide erfolgte durch Elution der Säule mit einem Gradienten von 0.1% Trifluoressigsäure in Wasser gegen 70% Acetonitril (enthaltend 0.075% Trifluoressigsäure), wobei der Gradient in 20 Minuten von 0% auf 60% und in weiteren 10 Minuten von 60% auf 100% gefahren wurde. Die eluierenden Peptide wurden gesammelt und deren Aminosäuresequenz auf einem Gasphasen-Sequenator 470A (Applied Biosystems) nach Vorschrift des Geräteherstellers bestimmt:

as 1750: A W A D E Q E I A I H I D G A R I W

as 1751: S T L D T A A Q H R

as 1753: A G H W G D P T L T G S

as 1758: E A A L F V V S G T M A N Q I A L G A L

Beispiel 6: Isolierung hochmolekularer genomischer DNA aus *Tolypocladium niveum*

Es wurden Protoplasten wie im Beispiel 18 beschrieben, hergestellt. Ca. 10^9 Protoplasten wurden vorsichtig in 2 ml TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) lysiert. Es wurde 0.1 mg/ml RNase A zugesetzt und 20 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 0.5 % SDS und 0.1 mg/ml Proteinase K wurde weitere 40 min bei 55 °C inkubiert. Der Ansatz wurde sehr schonend je zweimal mit TE-gesättigtem Phenol, Phenol/Chloroform (1:1) und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert (Maniatis et al., 1982). Der wässrige leicht viskose Überstand wurde mit einem Zehntel Volumen 3 M Natriumazetat (pH 5.2) versetzt, mit dem 2.5 fachen Volumen absolutem, -20 °C kaltem Ethanol überschichtet und die DNA in Form feiner Fäden mittels Glasstäben an der Phasengrenze aufgespult. Die DNA wurde in 3 ml TE mindestens 20 h gelöst. Je nach Qualität der Protoplasten wurden ca. 500 µg/ml DNA erhalten. Analyse mit FIGE (0.8 % Agarose, 0.5 x TBE (Maniatis et al. 1982), 6 V/cm, Vorwärtspuls 0.2 bis 3 sek, Puls-Verhältnis 3.0, Laufzeit 5 h) ergab eine Größe von mehr als 150 kb.

Beispiel 7: Konstruktion einer genomischen Lambda-Genbank von *Tolypocladium niveum*

Zweimal ca. 100 µg DNA aus Beispiel 6 wurden mit 9 bzw. 18 Einheiten des Restriktionsenzymys *Nde*II (Fa.Boehringer Mannheim) für 1 h bei 37°C in 1 ml Puffer (Tris-Acetat 33 mM, Magnesiumacetat 10 mM, Kaliumacetat 66 mM, DTT 0.5 mM, pH 7.9) geschnitten. Aliquots der Restriktionen wurden mittels FIGE überprüft und ergaben ein Maximum der erhaltenen Fragmente bei etwa 25 bzw. 10 kb.

Mit einem Gradientenmischer wurden in Ultrazentrifugenröhrchen lineare NaCl-

Dichtegradienten von 30 % bis 5 % in 3 mM EDTA pH 8.0 hergestellt und die DNAs aufgetragen. Nach Zentrifugation für 5 h bei 37000 Upm und 25 °C (Beckman Ultrazentrifuge L7-65, Rotor SW 41) wurde der Gradient in 500 µl Fraktionen geerntet. Nur Fraktionen mit DNA von mehr als 12 kb und weniger als 25 kb wurden dreimal 2 h gegen TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8.0) dialysiert, mit Ethanol gefällt und in je 50 µl TE gelöst.

Als Kloniervektor wurde Lambda DASH II (Fa.Stratagene) verwendet. Nach Restriktion des Vektors mit *Bam*HI und *Hind*III wurden die beiden Vektorarme präpariert, wie von Sambrook et al.(1989) angegeben. 1 µg davon wurden mit ca. 500 ng der DNA Fragmente in 20 µl Ligationsmix (Tris-HCl 66 mM, MgCl₂ 5 mM, DTE 1 mM, ATP 1 mM, pH 7.5) mit 16 Einheiten T4-DNA-Ligase (Fa.Boehringer Mannheim) 16 h bei 12 °C ligiert. Je 4 µl des Ansatzes wurden mit Packaging-Extrakten (Gigapak II, Fa.Stratagene) in Lambda Phagenhüllen verpackt. Als Wirtstamm für die Infektion wurde *E.coli* SRB (Fa.Stratagene) verwendet, die Bakteriophagen-Lambda kompetenten Zellen wurden nach Sambrook et al.(1989) hergestellt. Nach der Infektion wurden die Ansätze in Aliquots auf LB-Medium (Maniatis et al., 1982) mit 10 mM MgSO₄ plattiert, als Indikatorstamm wurde wiederum *E.coli* SRB verwendet. Rekombinante Klone wurden als Plaques im Bakterienrasen erkennbar. Ca. 50000 Plaques wurden mit SM-Puffer (5,8 g/l NaCl, 2 g/l MgSO₄ x 7H₂O und 50 mM Tris-Cl pH 7.5) abgeschwemmt, und die so erhaltene Genbank wurde in Aliquots bei 4 °C gelagert. Eine Titerbestimmung ergab ca. 1 x 10⁸ pfu/ml.

Eine Analyse von 30 willkürlich ausgewählten Klonen durch Isolierung und Restriktion der enthaltenen Lambda-DNA ergab, daß alle Klone rekombinante Lambda-Phagen enthielten; die durchschnittliche Insertgröße betrug 15 kb.

Beispiel 8: Konstruktion einer genomischen Cosmid-Genbank von *Tolypocladium niveum*

Zweimal 135 µg DNA aus Beispiel 6 wurden mit 7.5 bzw. 15 Einheiten des Restriktionsenzym *Nde*II, wie im Beispiel 7 beschrieben, geschnitten. Aliquots der Restriktionen wurden überprüft und ergaben ein Maximum der erhaltenen Fragmente bei etwa 45 bzw. 30 kb.

Mit einem Gradientenmischer wurden in Ultrazentrifugenröhrchen lineare NaCl-Dichtegradienten von 30 % bis 5 % in 3 mM EDTA pH 8.0 hergestellt und die DNAs

aufgetragen. Nach Zentrifugation wurde der Gradient in 500 µl Fraktionen geerntet. Nur Fraktionen mit DNA von mehr als 30 kb und weniger als 50 kb wurden dreimal 2 h gegen TE dialysiert, mit Ethanol gefällt und in je 50 µl TE gelöst.

Als Kloniervektor wurde sCos 1 (Fa.Stratagene) verwendet. Die *Bam*HI und *Xba*I geschnittenen Vektorarme wurden hergestellt und modifiziert wie von Evans et al (1989) angegeben. 1 µg davon wurden mit ca. 500 ng der DNA Fragmente ligiert und in Lambda Phagenhüllen verpackt. Als Wirtstamm für die Infektion wurde *E.coli* SRB (Fa.Stratagene) verwendet. Nach der Infektion wurden die Ansätze in Aliquots auf LB-Medium mit 75 µg/ml Ampicillin plattiert. Rekombinante Klone wurden als Kolonien nach 20 h bei 37 °C erkennbar. Insgesamt wurden ca. 50000 Kolonien erhalten, die dann in 0.9 % NaCl/20 % Glycerin suspendiert und bei -70 °C gelagert wurden. Eine Analyse von 40 willkürlich ausgewählten Klonen durch Isolierung und Restriktion der enthaltenen Cosmide ergab, daß alle Klone rekombinante Cosmide enthielten; die durchschnittliche Insertgröße betrug 36 kb.

Beispiel 9: Auswahl und Prüfung geeigneter Oligonukleotidgemische

Zur Herstellung der Hybridisierungssonde ließ sich aus der Aminosäureteilsequenz as1750 der Alanin Racemase (Beispiel 5) durch reverse Translation unter Verwendung des universellen genetischen Codes die folgende DNA-Sequenz ableiten:

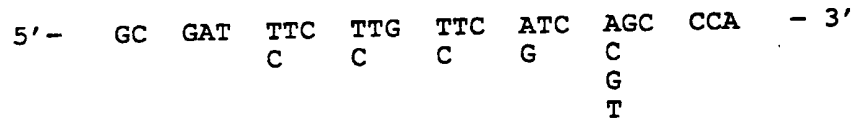
ALA TRP ALA ASP GLU GLN GLU ILE ALA ILE HIS ILE ASP GLY ALA ARG ILE TRP
GCN TGG GCN GAC GAA CAA GAA ATA GCN ATA CAC ATA GAC GGN GCN CGN ATA TGG
GAT GAG CAG GAG ATC ATC CAT ATC GAT AGA ATC
ATT ATT ATT AGG ATT

Davon ausgehend wurden drei Oligonukleotidgemische synthetisiert, die einem bestimmten Teil der Sequenz des nicht codierenden Stranges entsprechen (unterstrichener Bereich):

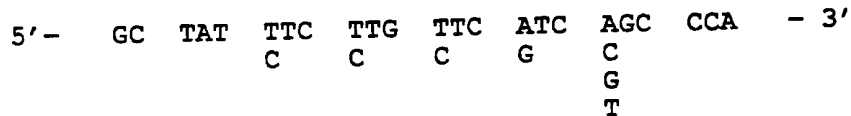
Oligo R13: Länge: 23mer 64fach degeneriert

5' - GC AAT TTC TTG TTC ATC AGC CCA - 3'
C C C G C
G
T

Oligo R14: Länge: 23mer 64fach degeneriert



Oligo R15: Länge: 23mer 64fach degeneriert



Je ca. 10 pmol dieser Oligonukleotid-Gemische wurden in 20 µl Puffer (50 mM Tris-Cl pH 7.6, 10 mM MgCl₂, 5 mM Dithiothreitol, 0.1 mM Spermidin HCl, 0.1 mM EDTA (pH 8)) mit 50 µCi gamma-³²P-ATP (6000 Ci/mmol) und 8 Einheiten T4-Polynukleotid-Kinase (Fa. Boehringer Mannheim) für 45 min bei 37 °C radioaktiv markiert. Mehr als 80 % der Radioaktivität wurden in die Oligonukleotide eingebaut.

Zum Testen der Hybridisierung wurden je 10 µg genomische DNA von *Tolypocladium niveum* (Beispiel 6) mit *SaII*, *EcoRI* und mit *HindIII* geschnitten und in Southern-Hybridisierungen untersucht. Das 0.8 % Agarosegel wurde mittels Vakuum-Blotting (Vacublot, Fa. Pharmacia) auf eine Nylon-Membran (Duralon-UV, Fa. Stratagene) übertragen. Die Vorhybridisierung wurde 16 h bei 37 °C in 5 ml / 100 cm² 6 x SSPE (Maniatis et al. 1982), 5 x Denhardt's Lösung (Maniatis et al., 1982), 0.5 % SDS, 100 µg/ml hitzedenaturierte Heringssperma-DNA, 0.1 mM ATP durchgeführt. Vor der Zugabe des entsprechenden ³²P-markierten Oligonukleotid-Gemisches wurde die Temperatur auf 65 °C erhöht, anschließend für je 1.5 h auf 55 °C, 45 °C und schließlich auf 37 °C gestellt. Die Hybridisierung wurde für 16 h bei 37 °C durchgeführt.

Die Membranen wurden 5 min und 30 min in 6 x SSC (Maniatis et al., 1982) bei 4°C gewaschen. Anschließend wurden die Membranen für 5 min bei Raumtemperatur in einer Tetramethylammoniumchlorid (TMAC) Waschlösung (3.00 M TMAC, 50 mM Tris (pH 8.0), 2 mM EDTA, 0.1 % SDS) (Wood et al., 1985) gewaschen. Schließlich wurde zweimal 40 min bei der stringenten Temperatur 56 °C in TMAC-Waschlösung gewaschen. Die Membranen wurden in Folie eingeschweißt und für 14 Tage mit Kodak Verstärkerfolie auf Röntgenfilm (XOmatik AR, Fa.Kodak) bei -70 °C exponiert.

Bei den Hybridisierungen mit den Oligonukleotidgemischen R13 und R15 konnten keine

Signale detektiert werden, während jene mit R14 positiv waren. Bei den Restriktionen wurde jeweils eine Bande erkennbar, für die Restriktion mit *SaII* wurde diese bei etwa 2.9 kb lokalisiert, für *EcoRI* und *HindIII* lagen die Größen jeweils über 6 kb.

Beispiel 10: Isolierung von Lambda-Klonen, die mit einem Alanin Racemase-spezifischen Oligonukleotid hybridisieren

Aliquots der Lambdabank aus Beispiel 7 wurden auf LB Medium (Maniatis et al., 1982) mit 10 mM MgSO_4 in einer geeigneten Verdünnung aufgebracht, um einen Titer von etwa 2500 Plaques je Platte zu erreichen. Es wurden insgesamt ca. 20000 Plaques untersucht. Der Transfer auf Nylon-Membranen (Duralon-UV, Fa. Stratagene) wurde wie vom Hersteller empfohlen durchgeführt. Das Screening der Genbank wurde unter gleichen Hybridisierungs- und Waschbedingungen durchgeführt, wie in Beispiel 8 beschrieben.

Es wurden vier positive Signale auf den Röntgenfilmen gefunden. Die entsprechenden Bereiche der Agaroseschicht der Platten wurden ausgestochen und in SM-Puffer (5,8 g/l NaCl, 2 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mM Tris-Cl pH 7.5) resuspendiert. Eine geeignete Verdünnung wurde erneut mit *E.coli* SRB auf LB-Medium mit 10 mM MgSO_4 plattiert, und die Plaques wurden wiederum auf Membranen übertragen. Durch neuerliche Hybridisierung und in der Folge durch eine dritte analog durchgeführte Hybridisierungsrunde wurden die positiven Klone gereinigt.

Die DNA der vier Lambda-Klone, Lambda RAC1 bis Lambda RAC4, wurde isoliert und durch Restriktionsanalysen und anschließende Hybridisierung mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotidgemisch R14 (Beispiel 9) untersucht. Es zeigte sich, daß unter anderem ein ca. 1.1 kb großes *PstI*-Restriktionsfragment ein positives Signal liefert. Abbildung 1 zeigt die Restriktionskarte des *Tolypocladium niveum*-Anteils eines solchen Lambda-Klons (=Lambda RAC4).

Beispiel 11: Klonierung von Subfragmenten aus Lambda RAC4

Um das ca. 1.1 kb große *PstI*-Fragment (Beispiel 10) zu klonieren, wurden ca. 10 µg Lambda RAC4 mit *PstI* vollständig geschnitten und das ca. 1.1 kb *PstI* Fragment aus einem 1.0 % Agarosegel eluiert (GeneClean II, Fa. Bio101). Der Plasmidvektor pUCBM20 (Fa. Boehringer

Mannheim) wurde ebenfalls mit *Pst*I restringiert und mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (Fa. Boehringer Mannheim) nach den Angaben der Hersteller behandelt. Je ca. 200 ng gereinigtes *Pst*I-Fragment aus Lambda RAC4 und pUCBM21 wurden mit 1 Einheit T4-DNA-Ligase ligiert. Nach Transformation in *E.coli* XL1 Blue (Fa. Stratagene) wurde das entsprechende Plasmid isoliert. Es wurde pRP1 genannt und durch Restriktionsanalysen charakterisiert; eine Restriktionskarte ist in Abbildung 2 dargestellt.

Analog dazu wurde auch noch das ca. 1.9 kb große *Eco*RI-*Sa*I-Fragment aus Lambda RAC4 (Abbildung 1) in den entsprechend geschnittenen Plasmidvektor pUCBM20 (Fa.Boehringer Mannheim) kloniert. Das entstandene Plasmid wurde pRP6 genannt und ist in Abbildung 3 dargestellt.

Als weiteres Fragment wurde das ca. 650 bp große *Hind*III-*Pst*I-Fragment aus Lambda RAC4 (Abbildung 1) in den ebenso geschnittenen Plasmidvektor pBluescript II SK+ (Fa.Stratagene) eingebaut. Das resultierende Plasmid wurde mit pRP9 bezeichnet und ist in Abbildung 4 dargestellt.

Mit diesen beiden letzten Konstruktionen wurde auch der benachbarte Bereich zu dem in der Hybridisierung mit R14 positiven *Pst*I-Fragment abgedeckt.

Beispiel 12: Isolierung des GAPDH - Gens aus *Tolypocladium niveum*

Aliquots der Cosmidbank aus Beispiel 8 wurden auf LB-Medium mit 70 µg/ml Ampicillin in einer geeigneten Verdünnung aufgebracht, um einen Titer von etwa 200 Kolonien je Platte zu erreichen. Der Transfer auf Nylon-Membranen und die Lyse der Kolonien wurde wie vom Hersteller empfohlen durchgeführt. Zur Präparation der Hybridisierungssonde wurden ca. 20 µg des Plasmids pAP21, das einen Teil des GAPDH-Gens aus *Penicillium chrysogenum* enthält (Pfitzner, 1988), vollständig mit dem Restriktionsenzym *Sa*I geschnitten. Das ca. 4 kb große *Sa*I-Fragment wurde aus einem 0.8 % Agarosegel eluiert (Geneclean II, Fa. Bio101) und mittels Nick-Translation radioaktiv mit alpha-³²P-dATP markiert (Sambrook et al.1989).

Zum Testen der Hybridisierung wurden 10 µg genomische DNA von *Tolypocladium niveum* (Beispiel 6) mit *Sac*I und mit *Hind*III geschnitten und in Southern-Hybridisierungen untersucht. Das 0.8 % Agarosegel wurde mittels Vakuum-Blotting (Vacublott, Fa. Pharmacia) auf eine Nylon-Membran übertragen. Die Vorhybridisierung wurde 7 h bei 42 °C in 5 x SSC,

40 % Formamid, 5 x Denhardt's (Maniatis et al., 1982), 0.1 % SDS, 0.25 mg/ml denaturierte Heringssperma-DNA, 25 mM NaH₂PO₄ pH 6.5 in einem Volumen von 10 ml pro 100 cm² Membran durchgeführt. Nach Zugabe der markierten Sonde wurde weitere 16 h bei 42 °C inkubiert. Der Blot wurde zweimal gewaschen. Nach Autoradiographie mit Kodak Verstärkerfolie auf Röntgenfilm (Xomatic AR, Fa. Kodak) wurde pro Restriktionsverdau jeweils nur eine Bande erkennbar (ca. 2.2. kb Fragment bei *SacI*, ca. 3.3 kb Fragment bei *HindIII*).

Das Screening der Cosmidbank wurde unter gleichen Hybridisierungs- und Waschbedingungen durchgeführt. Pro etwa 600 getestete Kolonien wurde eine positive Kolonie gefunden. Eine Kolonie wurde gereinigt und die Cosmid-DNA daraus isoliert. Das erhaltene Cosmid wurde gpdcos1 genannt. Durch Restriktionsverdau wurde die inserierte genomische *Tolypocladium niveum* DNA mit ca. 36 kb bestimmt. Restriktionsfragmente, die Teile des GAPDH-Strukturgens enthielten, wurden durch Hybridisierung von Southern Blots mit der Screening-Sonde identifiziert. Ein ca. 2.2 kb großes *SacI*-Restriktionsfragment ergab ein deutliches Signal; dies entsprach der Fragmentgröße in den Southern-Hybridisierungen mit genomischer DNA. Das Fragment wurde in den Plasmidvektor pUC18 (Fa. Boehringer Mannheim) umklontiert.

Dazu wurden ca. 10 µg gpdcos1 DNA mit *SacI* vollständig geschnitten und das 2.2 kb *SacI* Fragment aus einem 0.7 % Agarosegel eluiert. Der Plasmidvektor pUC18 wurde ebenfalls mit *SacI* restringiert und mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (Fa. Boehringer Mannheim) nach den Angaben der Hersteller behandelt. Je ca. 200 ng gereinigtes *SacI*-Fragment aus gpdcos1 und pUC18 wurden mit 1 Einheit T4-DNA-Ligase ligiert. Nach Transformation in *E.coli* HB101 wurde das entsprechende Plasmid isoliert. Es wurde pGT1 genannt und durch Restriktionsanalysen charakterisiert; eine Restriktionskarte ist in Abbildung 9 dargestellt.

Darüberhinaus wurde auch die vollständige Nukleotidsequenz des gesamten *SacI*-Fragmentes nach der Methode von Sanger (Sanger et al., 1977) mittels Sequenase (Fa. USB) bestimmt. Die Sequenz ist in Abbildung 10 dargestellt und umfaßt 2271 Nukleotide).

Beispiel 13: Isolierung von cDNA - Klonen des GAPDH - Gens aus *Tolypocladium niveum*

Um eine cDNA-Bank zu konstruieren, wurde zunächst die Roh-RNA, wie im Beispiel 17 beschrieben, isoliert. Die Anreicherung der poly(A⁺)-RNA geschah durch eine Oligo(dT)-Zel-

lulose-Affinitätschromatographie, wie sie in Maniatis et al.(1982) beschrieben ist. Dazu wurde die Roh-RNA nach Zentrifugation und Trocknung in Wasser gelöst. Nach der Chromatographie wurden Fraktionen, die poly(A⁺) -RNA enthielten, erneut mit Ethanol gefällt und bei -70°C aufbewahrt. Die Integrität der RNA wurde durch Gelelektrophorese in Gegenwart von Formaldehyd überprüft, die Konzentration wurde durch UV-Absorption bestimmt. 5 µg der poly(A⁺)-RNA wurden mit Reverser Transkriptase und einem oligo(dT)-Primer in Gegenwart der vier Desoxynukleosidtriphosphate in eine komplementäre einzelsträngige DNA umgesetzt. Durch die Enzyme RNaseH und DNA-Polymerase wurde daraus ein doppelsträngiges Molekül synthetisiert (Sambrook et al., 1989). Nach dem enzymatischen Anfügen von geeigneten *EcoRI*-Adaptoren, wozu Polynukleotidkinase und T4-DNA-Ligase verwendet wurden, erhielt man eine lineare doppelsträngige cDNA, die in Kloniervektoren eingebaut werden konnte. Für diese Umsetzungen wurde ein cDNA-Synthese-Kit verwendet (Fa. Pharmacia), der die nötigen Enzyme und das Adapter-Oligonukleotid enthält. Die Durchführung der Reaktionen erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die synthetisierte cDNA wurde in den Vektor λ gt10 (Sambrook et al., 1989) einkloniert. 80 µl der cDNA-Präparation wurden dazu mit 16 µl λ gt10-DNA (8 µg) vermischt, die vorher mit *EcoRI* gespalten und mit alkalischer Phosphatase behandelt wurde. Nach Zugabe von 3 µl 3M Natriumazetat (pH 5,2) wurde die DNA mit Ethanol gefällt. Die DNA wurde dann in 30 mM Tris-Cl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTE, 2,5 mM ATP nach Zugabe von 0,5 U T4-DNA-Ligase 16 h bei 16°C ligiert (DNA-Konzentration 500 µg/ml). Das Ligationsgemisch wurde mit Hilfe von Protein-Extrakten *in vitro* verpackt. Die entstandenen λ -Lysate wurden mit *E. coli* C600hfl (Fa. Promega Inc.) getitert. Erhalten wurden etwa $4,5 \times 10^5$ pfu.

Als Sonde für das Screening wurde das 665 bp große *HindIII-HindII* Restriktionsfragment aus dem Plasmid pGT1 (siehe Beispiel 12) verwendet. Dazu wurden 10 µg DNA von pGT1 mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *HindII* (Fa.Boehringer Mannheim) nach den Angaben der Hersteller geschnitten und das entsprechende Restriktionsfragment aus einem 0.8 % Agarosegel isoliert. Nach Markierung mit alpha-³²P-dATP über Random-Primer Polymerisation (Fa. Stratagene) wurde das Fragment zur Hybridisierung eingesetzt.

Die Vorhybridisierung wurde 20 h, die Hybridisierung 18 h bei 42 °C in 6 x SSC, 50 % Formamid, 1 % SDS, 50 µg/ml Heringssperma-DNA durchgeführt. Die Filter wurden 2 x 10 min in 2 x SSC / 0.1 % SDS bei 25 °C und 2 x 45 min in 1 x SSC / 0.1 % SDS bei 60 °C gewaschen. Die Membrane wurden 14 h auf Röntgenfilm (Xomatic AR, Fa. Kodak) expo-

niert. 2.5 bis 3.5 % aller Plaques zeigten ein starkes Signal.

Regionen mit einzelnen solcher positiver Plaques wurden aus der Platte ausgestochen und durch zwei weitere Hybridisierungsrunden mit verdünnten Plattierungen analog zur ersten gereinigt. Lambda-DNA wurde nach Standardmethoden isoliert (Sambrook et al. 1989). Die ca. 1.3 kb großen cDNA-Inserts aus 2 verschiedenen Klonen wurden als *EcoRI*-Fragmente in das Plasmid pUCBM20 (Fa. Boehringer Mannheim) und den Phagenvektor M13mp18 (Fa. Boehringer Mannheim) nach Standardmethoden eingebaut. Die entstandenen Konstruktionen wurden pGT4 und pGT5 bzw. M13GT4 und M13GT5 benannt. Mit Hilfe der M13-Klone wurde einzelsträngige DNA hergestellt, die mittels der Didesoxynukleotid-Methode nach Sanger (Sanger et al., 1977) von beiden Enden her ansequenziert wurden. Es zeigte sich, daß das Insert von Klon M13GT4 einen 33 bp langen PolyA-Bereich aufweist, bei Klon M13GT5 fehlten 2 bp am 5'-Ende und 20 bp am 3'-Ende, sowie der PolyA-Bereich.

Eine Restriktionskarte des offensichtlich vollständigen cDNA-Klons pGT4 ist in Abbildung 11 dargestellt. Die gesamte Nukleotidsequenz der cDNA wurde bestimmt; sie umfaßte 1333 Nukleotide ohne Adaptor-Moleküle und ist in Abbildung 12 angeführt. Ein Vergleich der genomischen und der cDNA-Sequenz zeigte die Lage von zwei Introns, wobei eines am Anfang des *SacI*-Fragmentes liegt, wie aus Abbildung 14 hervorgeht. Daraus wurde deutlich, daß der Promotorbereich des GAPDH-Gens nicht auf dem genomischen *SacI*-Fragment aus pGT1 (siehe Beispiel 12) enthalten ist.

Beispiel 14: Isolierung des Promotorbereiches des GAPDH-Gens aus *Tolypocladium niveum*

20 µg DNA des Cosmidklones gpdcos1 (siehe Beispiel 12) wurden gemeinsam mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *SalI* geschnitten. Durch Southernhybridisierung mit dem 665 bp großen *HindIII-HindII*-Fragment aus pGT1 wurde ein ca. 1250 bp großes Fragment identifiziert. Dieses wurde aus einem 0.8 % Agarosegel präpariert und nach Standardmethoden (Sambrook et al., 1989) in den *SalI*-geschnittenen und dephosphorylierten Plasmidvektor pBluescriptII SK+ (Fa. Stratagene) und in den ebenso behandelten Phagenvektor M13mp18 eingebaut. Die vollständige Nukleotidsequenz des Inserts wurde nach der Methode nach Sanger (Sanger et al., 1977) bestimmt. Sie ist in Abbildung 13 dargestellt und entspricht dem Sequenzbereich von bp 1 bis 1278 in Abbildung 14. Der Vergleich der genomischen Sequenz des gesamten vorliegenden Promotor und Strukturgen-Bereiches mit der cDNA-

Sequenz zeigte die Lage zweier Introns (Abbildung 14). Das erste liegt im 5'-nicht translatierten Bereich von Pos. 550 bis 664 (115 bp), das zweite wesentlich längere Intron liegt im eigentlichen Strukturgen und wurde bei Pos. 802 bis 1218 lokalisiert (417 bp). Aus der Translation der cDNA-Sequenz ergab sich eine 338 Aminosäuren lange Primärsequenz der GAPDH aus *Tolypocladium niveum* mit einer abgeleiteten relativen Molmasse von 36121.

Beispiel 15: Bestimmung von Teilsequenzen des Alanin Racemase Gens

Die zusammengefügte Nukleotidsequenz des ca. 1,1 kb große *Pst*I-Insert in pRP1, des ca. 1,9 kb grosse *Eco*RI-SalI-Fragment aus pRP6, des ca. 650 bp grossen *Pst*I-HindIII-Fragment aus pRP9, sowie noch zusätzlich 511 bp anschliessend an die HindIII-Stelle ist in Abbildung 5 dargestellt und umfaßt 3973 Nukleotide.

Die Sequenzierung erfolgte nach der modifizierten Didesoxynukleotid-Methode unter Verwendung von Sequenase (Fa. United States Biochemical) nach den Angaben des Herstellers.

Beispiel 16: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen

Translatiert man die Nukleotidsequenz aus Beispiel 15, so findet man von Pos. 2557 bis Pos. 2610 der Abbildung 5 den Bereich der Aminosäureteilsequenz as 1750 wieder, die ja auch zur Ableitung der Screeningsonde diente:

2557		2610
	GCT TGG GCT GAC GAG CAG GAG ATC GCC ATT CAC ATC GAC GGT GCG CGG ATA TGG	
	ALA TRP ALA ASP GLU GLN GLU ILE ALA ILE HIS ILE ASP GLY ALA ARG ILE TRP	
= <u>as 1750</u>		

Außerdem finden sich folgende weitere Teilsequenzen:

2992		3021
	TCC ACA CTG GAC ACG GCT GCT CAG CAC CGT	
	SER THR LEU ASP THR ALA ALA GLN HIS ARG	

= as 1751

1983

2018

GCA CGT CAT TGG GGA GAT CCC ACT CTC ACT GGC TCA

ALA GLY HIS TRP GLY ASP PRO THR LEU THR GLY SER

= as 1753

2242

GAA GCA GCT CTG TTT GTT GTG TCC GGG ACC ATG GCC AAC CAG ATT GCC TTA GGA

GLU ALA ALA LEU PHE VAL VAL SER GLY THR MET ALA ASN GLN ILE ALA LEU GLY

2301

GCG CTG

ALA LEU

= as 1758

Die Lage der aufgefundenen Aminosäureteilsequenzen in dem bestimmten Sequenzbereich ist in Abbildung 6 dargestellt. Es ergibt sich daraus eine Lage des Gens in SalI -> HindIII Richtung.

Beispiel 17: Isolierung von RNA aus dem Mycel von *Tolypocladium niveum* und Northernhybridisierung

Ein 1l-Erlenmeyerkolben mit 100 ml Medium 4 (Dreyfuss et al., 1976), wurde mit einer Sporensuspension von *Tolypocladium niveum* ATCC34921 beimpft (ca. 1×10^7 Sporen/ml) und 96 h bei 250 Upm und 25°C geschüttelt. Ein 1l-Erlenmeyerkolben mit 100 ml Medium 5 (Dreyfuss et al., 1976) wurde mit 10 ml der Vorkultur beimpft und 7 Tage bei 25°C und 250 Upm geschüttelt. Die Konzentration von Cyclosporin A wurde bestimmt (Dreyfuss et al., 1976). Erreicht wurden ca. 100 µg/ml. Aus ca. 6 g Mycelfeuchtmasse wurde RNA isoliert; dazu wurde das Mycel abzentrifugiert, mit 40 ml TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 7.5) gewaschen und unter flüssigem Stickstoff in einer Reibschale zu einem feinem Pulver zerrieben. Die RNA-Isolierung erfolgte nach der leicht modifizierten Methode von Chomczynski und Sacchi (1987). Dazu wurden je 1 g Feuchtmycel mit 20 ml RNazol (Fa. Biomedica) nach den Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Erhalten wurden ca. 0.7 mg RNA je 1 g Feuchtmycel, die ethanolgefällt bei -20°C aufbewahrt wurden. 10 µg der RNA wurden auf

einem 1 %igen Agarose-Gel, das 0.6 M Formaldehyd enthielt, nach der bei Sambrook et al. (1989) beschriebenen Methode aufgetrennt. Die Proben wurden 2 min auf 95 °C erhitzt und bei konstanten 70 V 2.5 h aufgetrennt. Das Gel wurde dreimal 20 min in 2 x SSC geschüttelt, auf Duralon UV Membranen (Fa. Stratagene) mittels Vakuum geblottet und durch UV-Behandlung fixiert.

Als Hybridisierungssonde wurde das 1078 bp große *Pst*I Restriktionsfragment aus dem Plasmid pRP1 (siehe Beispiel 11) verwendet, als Hybridisierungssonde für das GAPDH-Gen diente das 665 bp grosse HindIII-HindII Restriktionsfragment aus dem Plasmid pGT1 (Beispiel 12).

Dazu wurden ca. 10 µg DNA von den Plasmiden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (Fa.Boehringer Mannheim) nach den Angaben der Hersteller geschnitten und das entsprechende Restriktionsfragment aus einem 0.8 % Agarosegel mittels Adsorption an Glas-"Beads" (Geneclean II, Fa. Bio101) isoliert. Nach Markierung mit alpha-³²P-dATP über Random-Primer Polymerisation (Fa. Stratagene) wurde das Fragment zur Hybridisierung eingesetzt.

Die Vorhybridisierung wurde 20 h, die Hybridisierung 18 h bei 42 °C in 6 x SSC, 50 % Formamid, 5 x Denhardt's (Maniatis et al., 1982), 0.1 % SDS, 0.25 mg/ml denaturierte Heringssperma-DNA, 25 mM NaH₂PO₄ pH 6.5 in einem Volumen von 10 ml pro 100 cm² Membran durchgeführt. Der Blot wurde zweimal 10 min mit 2 x SSC / 0.1 % SDS bei 25 °C und zweimal 30 min mit 0.5 x SSC / 0.1 % SDS bei 60 °C gewaschen. Nach Autoradiographie mit Kodak Verstärkerfolie auf Röntgenfilm (Xomatic AR, Fa. Kodak) für ca. 48 - 96 h bei -70 °C wurde sowohl im Fall des Alanin Racemase Gens, als auch des GAPDH-Gens eine Bande auf dem Röntgenfilm sichtbar.

Beispiel 18: Protoplastierung von *Tolypocladium niveum*

200 ml Medium 1 (Maltose (Monohydrat) 50 g/l, Caseinpepton, tryptisch verdaut (Fluka 70169) 10 g/l, KH₂PO₄ 5 g/l, KCl 2.5 g/l pH 5.6) in einem Erlenmeyerkolben wurden mit 10⁹ Sporen von *Tolypocladium niveum* ATCC34921 beimpft und bei 27 °C, 250 Upm für ca. 70 h inkubiert. Es wurden 200 µl (0.1 %) β-Mercaptoethanol zugesetzt und weitere 16 h inkubiert. Das Mycel wurde durch Zentrifugation geerntet (Beckman Zentrifuge J2-21, Rotor JA14, 8000 Upm, 20 °C, 5 min), in 40 ml TPS (NaCl 0.6 M, KH₂PO₄ / Na₂HPO₄ 66 mM pH

6.2) gewaschen und das Pellervolumen durch Zentrifugation in kalibrierten Röhrchen bei 2000 g (in Beckman Zentrifuge GPR, Rotor GH3.7, 3000 Upm, 5 min) abgemessen. Das Mycel wurde in TPS suspendiert (je 1 ml Pellervolumen wurden 3 ml TPS verwendet) und das gleiche Volumen Protoplastierungslösung zugesetzt (Novozym 234 10 mg/ml (Fa. Novo Industri, Charge PPM-2415), Cytohelicase 5 mg/ml (Fa. IBF), Zymolyase 20T 1 mg/ml (Fa. Seikagaku Kogyo, C.No.120491) in TPS). Es wurde bei 27 °C und 80 Upm für ca. 60 min inkubiert. Die Protoplasten wurden durch Milchfilter filtriert, abzentrifugiert (700 g, 10 min) und in insgesamt 4 ml TPS aufgenommen. Je 1 ml dieser Suspension wurde auf 4 ml 35% Saccharose-Lösung aufgetragen und bei 600 g, 20 °C, für 20 min zentrifugiert. Die Protoplasten-Banden an der Phasengrenzfläche wurden abgezogen, mit TPS auf je 10 ml verdünnt, abzentrifugiert, in je 200 µl TPS vorsichtig resuspendiert und die Suspensionen vereinigt. Pro 1 ml Pellervolumen Ausgangsmycel (siehe oben) wurden ca. 2×10^8 Protoplasten erhalten.

Beispiel 19: Transformation von *Tolyocladium niveum*

Die Protoplastensuspension aus Beispiel 18 wurde abzentrifugiert (700 g, 10 min) und in 1 M Sorbit, 50 mM CaCl_2 in einer Dichte von 1×10^8 suspendiert. Jeweils 90 µl dieser Suspension wurden mit 10 µl der zu transformierenden Vektor-DNA versetzt (1 - 10 µg, gelöst in Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) und 25 µl PEG 6000-Lsg zugegeben (25 % PEG 6000, 50 mM CaCl_2 , 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, frisch hergestellt aus den Stammlösungen: 60 % PEG 6000 (Fa.BDH), 250 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM CaCl_2). Der Transformationsansatz wurde 20 min auf Eis gestellt und anschließend wurden weitere 500 µl der gemischten PEG 6000-Lösung zugegeben und vorsichtig durchmischt. Nach 5 min bei Raumtemperatur wurde 1 ml 0.9 M NaCl, 50 mM CaCl_2 zugesetzt, der ganze Ansatz zu 7 ml aufgeschmolzenem und auf 45 °C temperiertem Weichagar des entsprechenden Selektionsmediums gegeben und auf entsprechende, vorgewärmte Platten ausgegossen.

Im Falle, daß die zu transformierenden Vektor-DNA das *amdS*-Gen aus *Aspergillus nidulans* enthält, z.B. Plasmid p3SR2 (Hynes et al., 1983), wurde der ganze Ansatz zu 7 ml aufgeschmolzenem und auf 45 °C temperiertem Weichagar TMMAAC+N gegeben und auf vorgewärmte TMMAAC+N Platten ausgegossen. Medium TMMAAC+N enthält Glukose 6 g/l, KH_2PO_4 3 g/l, KCl 0.5 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0.4 g/l, $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/l, Acrylamid 8 mM, CsCl 2.1 g/l, Spurenelement-Lösung 1 ml/l, 0.6 M NaCl; für Platten wurden 15 g/l für Wei-

chagar 7 g/l Agar-Agar (Merck) zugesetzt. Die Spurenelement-Lösung enthält 1 mg/ml $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 9 mg/ml $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,4 mg/ml $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 0,1 mg/ml $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,1 mg/ml H_3BO_3 und 0,1 mg/ml $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Transformanten waren in der Lage, Acrylamid als Stickstoffquelle im Medium zu nutzen und konnten daher nach etwa drei Wochen bei 25 °C als Kolonien gegenüber schwachem Hintergrundwachstum identifiziert werden.

Für die Transformation mit dem Hygromycin-Resistenzgen wurde der Ansatz in 7 ml TM88-NaCl-Weichagar (20 g/l Malt extract, 4 g/l Yeast extract, 10 g/l Bacto Agar, 0,6 M NaCl, pH 5,7) (45°C) gegeben und auf TM88-NaCl-Platten (ca. 20 ml TM88-NaCl-Agar: 20 g/l Malt extract, 4 g/l Yeast extract, 30 g/l Bacto Agar, 0,6 M NaCl, pH 5,7) ausgegossen. Nach 15 - 20 h bei 25°C wurde mit 7 ml TM88-NaCl-Weichagar mit 500 µg/ml Hygromycin (Boehringer Mannheim) (45°C) überschichtet. Hygromycinresistente Transformanten ließen sich nach 7 Tagen bei 25 °C als Kolonien auf den Platten nachweisen.

Beispiel 20: Konstruktion des Vektors pGT24

Basierend auf der bestimmten Nukleotidsequenz des GAPDH-Gens (siehe Beispiel 14) wurden folgende Oligonukleotide abgeleitet und synthetisiert:

P3 5' CGACCTCGAGAACATTCGTTGTGCACCGT 3'

P4 5' GGGGATCCATGGTGTACGCTGCGGAGTTAGCGG 3'

P3 entspricht von seiner Pos. 5 - 29 dem Bereich von Pos. 1 - 25 der Nukleotidsequenz der Abbildung 14 des GAPDH-Gens, enthält also die natürliche *Xho*I-Schnittstelle (CTCGAG); P4 entspricht dem Bereich von Pos. 670 bis 650 (komplementär zur Sequenz des GAPDH-Gens) die ersten 12 Nukleotide von P4 enthalten die Erkennungsstellen für die Restriktionsenzyme *Nco*I (CCATGG) und *Bam*HI (GGATCC). Mit Hilfe dieser Primer wurde aus der genomischen DNA von *Tolypocladium niveum* der zwischen den Primern liegende Bereich amplifiziert (35 Zyklen: 2 min 95 °C, 1 min 20 sek 56 °C, 1 min 20 sek 72 °C). Das gebildete DNA-Fragment von ca. 680 bp Größe wurde nach Chloroformextraktion und Ethanol-fällung mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Xho*I geschnitten (nach

Angaben des Herstellers, Fa. Boehringer Mannheim) und nach Standardmethoden in die ebenso präparierte Plasmid-Vektor-DNA pBluescriptII SK+ (Fa. Stratagene) eingebaut. Das resultierende Plasmid wurde pGT12 genannt und ist in Abbildung 16 dargestellt.

Analog wurden die folgende Oligonukleotide wurden aus der Nukleotidsequenz des GAPDH-Gens abgeleitet und synthetisiert:

P8: 5' GGGGCGGCCCGCCATGGAGAATAGACACG 3'

P9: 5' CCCC GCGGGCTCTTCTTTTCTGTTG 3'

Der Primer P8 entspricht in seinen Pos. 10 bis 28 den Pos. 2301 bis 2319 in der Abbildung 14, in den Pos. 4 bis 11 ist eine Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym *NotI* (GCGGCCGC) enthalten. Der Primer P9 entspricht in seinen Pos. 9 bis 28 dem komplementären Strang der Pos. 2855 bis 2838 in der Abbildung 14, die Pos. 3 bis 8 stellen die Erkennungsstelle für das Enzym *KspI* (CCGCGG) dar. Die Primer schließen den Bereich des vermutlichen Terminationsbereiches des GAPDH-Gens ein. Mit ihrer Hilfe wurde, gleich wie oben beschrieben, das entsprechende DNA-Fragment aus der genomischen DNA von *Tolypocladium niveum* amplifiziert. Das entsprechende DNA-Fragment wurde aus der genomischen DNA von *Tolypocladium niveum* amplifiziert. Nach Restriktion dieser amplifizierten DNA mit den Enzymen *NotI* und *KspI* (nach Angaben des Herstellers, Fa. Boehringer Mannheim) wurde das Fragment in den ebenso präparierten Vektor pGT12 nach Standardmethoden eingebaut. Das resultierende Vektor-Plasmid wurde pGT14 genannt und ist in Abbildung 17 dargestellt.

DNA des Plasmides pMAT5 (Mohr, 1988) wurde mit dem Enzym *BamHI* (nach Angaben des Herstellers, Fa. Boehringer Mannheim) vollständig geschnitten und das ca. 1.1 kb große DNA Fragment nach Elektrophorese aus dem Agarosegel präpariert. Das Plasmid pGT14 wurde ebenfalls mit *BamHI* geschnitten und mittels alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm behandelt (nach Angaben des Herstellers, Fa. Boehringer Mannheim). Das ca. 1.1 kb große *BamHI*-Fragment aus pMAT5 wurde nach Standardmethoden einligiert, in *E.coli* XL1-Blue (Fa.Stratagene) eintransformiert und die Plasmid-DNA einiger resultierender Klone isoliert. Das resultierende Vektor-Plasmid wurde pGT24 genannt. pGT24 enthält das Hygromycinresistenzgen in der richtigen Orientierung zum GAPDH-Promotor und ist in

Abbildung 8 dargestellt.

Beispiel 21: Zerstörung des Alanin Racemase Gens in *Tolypocladium niveum*

Das ca. 835 bp große *EcoRI-PstI*-Fragment aus pRP1 wurde analog zu der in Beispiel 11 dargestellten Vorgangsweise in den Plasmidvektor pUCBM20 (Fa. Boehringer Mannheim) eingebaut, das konstruierte Plasmid wurde pRP12 genannt und ist in Abbildung 7 dargestellt. Als Transformationsvektor wurde das Plasmid pGT24 eingesetzt, welches das Hygromycinresistenzgen unter der Kontrolle des *Tolypocladium niveum* GAPDH-Gens enthält. Gemeinsam mit dieser DNA wurden auch äquimolare Mengen pRP12-DNA im gleichen Transformationsansatz mit eingesetzt. Diese Cotransformationen wurden nach der in Beispiel 19 beschriebenen Methode durchgeführt, als Ausgangsstamm wurde *Tolypocladium niveum* ATCC 34921 eingesetzt.

Genomische DNA aus hygromycinresistenten Transformanten wurde nach einer Schnellmethode isoliert. Dazu wurde etwa von 1 cm² Fläche der entsprechenden Kolonie das Mycel abgenommen und in Eppendorf-Homogenisatoren überführt. Es wurden 1 ml Lysepuffer (50 mM EDTA, 0.2 % SDS) und 100 mg Aluminiumoxid (Typ A%, Fa. Sigma) zugegeben und ca. 5 min gut homogenisiert. Nach einer Zentrifugation (5 min, 11000 Upm) wurde der Überstand je einmal mit Tris-gesättigtem Phenol, Phenol/Chloroform (1:1) und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert und die DNA mit Isopropanol nach Standardvorschrift gefällt (Sambrook et al., 1989).

Die DNA wurde vollständig mit dem Restriktionsenzym *SalI* restringiert, durch Gelelektrophorese aufgetrennt und in Southern-Hybridisierungen untersucht. Das 0.8 % Agarosegel wurde mittels Vakuum-Blotting (Vacublot, Fa. Pharmacia) auf eine Nylon-Membran (Duralon-UV, Fa. Stratagene) übertragen und durch UV fixiert.

Die Vorhybridisierung wurde ca. 8 - 16 h bei 42 °C in 6 x SSC, 50 % Formamid, 5 x Denhardt's (Maniatis et al., 1982), 0.1 % SDS, 0.25 mg/ml denaturierte Heringssperma-DNA, 25 mM NaH₂PO₄ pH 6.5 in einem Volumen von 10 ml pro 100 cm² Membran durchgeführt. Nach Zugabe der markierten Sonde wurde weitere 16 - 20 h bei 42 °C inkubiert. Der Blot wurde zweimal 10 min mit 2 x SSC / 0.1 % SDS bei 25 °C und zweimal 30 min mit 0.5 x SSC / 0.1 % SDS bei 60 °C gewaschen. Nach Autoradiographie mit Kodak Verstärkerfolie auf Röntgenfilm (Xomatic AR, Fa. Kodak) für ca. 48 - 96 h bei -70 °C wurden Banden auf

dem Röntgenfilm sichtbar.

Die meisten der untersuchten DNAs zeigten das Signal des nativen ca. 2.9 kb großen *SaII*-Fragmentes, welches das ca. 835 bp *EcoRI-PstI*-Fragment enthält (Abbildung 1). Etwa 60 - 70 % der DNAs zeigten darüberhinaus auch noch zusätzliche Banden, die auf nicht homologe Integrationen des Plasmids pRP12 zurückzuführen sind. Neben diesen Typen von Transformanten-DNAs gab es jedoch auch vereinzelt DNAs, welche das Signal des nativen *SaII*-Fragmentes nicht mehr aufwiesen. In solchen Stämmen ist das Alanin Racemase Gen durch Integration des Plasmids pRP12 zerstört worden.

Auf diese Weise verifizierte Stämme wurden in Testfermentationen im Schüttelkolben auf Cyclosporin A Bildung untersucht, wie von Dreyfuss et al. (1976) beschrieben. Während in den parallel durchgeführten Versuchen mit dem nicht transformierten und intakten Ausgangsstamm *Tolypocladium niveum* ATCC 34921 noch Cyclosporin A gebildet wurde, konnte in Versuchen mit jenen Stämmen, in denen das Alanin Racemase Gen zerstört wurde, praktisch kein Cyclosporin A mehr nachgewiesen werden (<5 mg/l).

Beispiel 22: Cotransformation mit Lambda RAC4

Analog zu Beispiel 21 wurde der Transformationsvektor pGT24 verwendet. Gemeinsam mit dieser DNA wurden auch äquimolare Mengen Lambda RAC4 (Beispiel 10) im jeweils gleichen Transformationsansatz mit eingesetzt. Als Ausgangsstamm für diese Cotransformationen wurde *Tolypocladium niveum* ATCC 34921 eingesetzt.

Genomische DNA aus hygromycinresistenten Transformanten wurde isoliert, und durch Southernhybridisierungen untersucht, wie in Beispiel 21 beschrieben. Als Sonde für die Hybridisierungen wurden Restriktionsfragmente des Genbankvektors Lambda DASH II durch "Random Primer" Markierung (Fa. Stratagene) mit alpha ³²P dATP radioaktiv markiert.

Einzelne der untersuchten DNAs zeigten Hybridisierungssignale, die auf Integration von Lambda RAC4 zurückzuführen sind. Auf diese Weise verifizierte Transformantenstämme wurden in einer Testfermentation im Schüttelkolben auf Cyclosporin A Bildung untersucht, wie von Dreyfuss et al. (1976) beschrieben wurde. Während in dem parallel durchgeführten Versuch mit dem nicht transformierten Ausgangsstamm *Tolypocladium niveum* ATCC 34921 ca. 90 - 100 µg/ml Cyclosporin A gebildet wurde, konnte im Versuch mit jenem Stamm, in dem zusätzliche Kopien des Alanin Racemase Gens durch Integration von Lambda RAC4

vorhanden sind, ca. 150 µg/ml Cyclosporin A nachgewiesen werden.

Beispiel 23: Herstellung von 8-D-Serin Cyclosporin A durch Stämme mit zerstörtem Gen für die Alanin Racemase

Transformantenstämme, in denen das Alanin Racemase Gen nach dem in Beispiel 21 beschriebenen Verfahren durch Integration des Plasmids pRP12 zerstört worden war, sowie der Ausgangsstamm *Tolypocladium niveum* ATCC 34921, wurden in Schüttelkolbenfermentationen untersucht, bei denen im Medium D-Serin angeboten wurde.

Dazu wurden 100 ml Vorkulturmedium (75 g/l Glukose, 10 g/l Pepton, 250 mg/l KH_2PO_4 , 1.5 g/l KCl, pH 7.4) in 500 ml Erlenmeyerkolben mit ca. 10^7 Sporen des entsprechenden zu untersuchenden Stammes beimpft und für 4 bis 7 Tage bei 27 °C und 200 Upm inkubiert. Davon ausgehend wurden 20 ml Hauptkulturmedium (40 g/l Glukose, 40 g/l Fruktose, 10 g/l Pepton, 5 g/l KH_2PO_4 , 2 g/l KCl, 5 g/l DL-2-Aminobuttersäure, 4 g/l D-Serin, pH 5.5) mit 2 ml Vorkultur inokuliert und unter gleichen Bedingungen weitere 7 - 20 Tage fermentiert. Das gebildete Cyclosporin A (CyA) und 8-D-Serin-Cyclosporin A (DSA) wurde bestimmt. Es zeigte sich, daß der Ausgangsstamm *Tolypocladium niveum* ATCC 34921 unter diesen Bedingungen ca. 50 mg/l CyA und weniger als 5 mg/l DSA bildet. Ein untersuchter "gene-disruption" Stamm aus Beispiel 21 bildete hingegen <5 mg/l CyA und ca. 60 mg/l DSA.

Beispiel 24: Transformation von *Tolypocladium niveum* mit pGT24

DNA des Plasmids pGT24 wurde zur Transformation herangezogen, wie in Beispiel 19 beschrieben wurde. Als Ergebnis wurden zahlreiche, Hygromycin-resistente *Tolypocladium niveum*-Kolonien erhalten. Dies bestätigte, daß das in den Expressionsvektor pGT14 eingebaute Gen (Hygromycin-Resistenzgen aus *E.coli*) effizient exprimiert wurde.

Durch Isolierung der DNA solcher Transformanten, Restriktion der DNA, z.B. mit *Bam*HI, Elektrophorese und Blotten auf Nylonmembranen (nach Standardtechniken, Sambrook et al., 1989) konnte mittels Hybridisierung mit dem ca. 1.1 kb großen *Bam*HI-Fragment bestätigt werden, daß das Plasmid pGT24 ein- oder mehrmals im Genom vorliegt.

Beispiel 25: Konstruktion des Vektors pGT30

Auf Grund der, in Abbildung 13 wiedergegebenen DNA-Sequenz wurde ein Oligonukleotid synthetisiert, das folgende Sequenz aufweist:

5' GG ATC GAT TTT GTA CGC TGC GGA GTT AGC 3'

Die Positionen 9 bis 29 dieses Oligonukleotides sind komplementär zu der in Abbildung 13 gezeigten Sequenz (Pos. 652 bis 672); es umfaßt also den Bereich unmittelbar vor dem Startcodon. Die ersten acht Positionen entsprechen einer *ClaI*-Erkennungsregion (ATCGAT). Ein zweites Oligonukleotid hat die Sequenz:

5' GG ACT AGT ACC TTG TTG GAG TGG TGA GAT 3'

Dies entspricht den Positionen 62 bis 82 der Nukleotidsequenz in Abbildung 13. Die ersten acht Nukleotide enthalten eine *SpeI*-Erkennungsregion. 20 ng DNA aus *Tolypocladium niveum* wurde mit den oben beschriebenen Oligonukleotiden amplifiziert (Sambrook et al., 1989): 30 Zyklen: 1 min 30 sek 94°C; 2 min 30 sek 55°C; 6 min 72°C. Es entstand eine DNA von ca. 620 bp. Diese DNA wurde nach Chloroform-Extraktion durch Ultrafiltration (Ultrafree MC 100 000; Millipore) gereinigt und im entsprechenden Puffer mit den Enzymen *SpeI* und *ClaI* gespalten. 50 ng dieser DNA wurden mit 50 ng *SpeI* und *ClaI*-gespaltener DNA des Plasmides pCSN44 (Staben et al., 1989) ligiert. Eine Restriktionskarte dieses Plasmides (pGT30) ist in Abbildung 18 wiedergegeben.

Beispiel 26: Transformation von *Tolypocladium niveum* mit pGT30

Das Plasmid pGT30 kann zur Transformation von *Tolypocladium niveum* verwendet werden, wie im Beispiel 19 beschrieben ist. DNA aus solchen Transformanten wurde mit *BamHI* gespalten und nach Gelelektrophorese auf eine Nylon-Membran geblottet. Als radioaktive Sonde wurde das 0,6 kb *SpeI-ClaI*-Fragment aus pGT30 verwendet. Dadurch lassen sich solche Transformanten identifizieren, bei denen das Plasmid pGT30 ein- oder mehrmals im Genom integriert vorliegt.

Beispiel 27: Sequenzierung von cDNA und Lokalisierung des Strukturgens

Wie aus dem Vergleich der Aminosäureteilsequenzen zu erkennen ist (siehe Beispiel 16), wechselt der Leserahmen zwischen den für as1758 codierenden Sequenzen, was auf ein Intron schliessen lässt. Es wurde daher RNA isoliert und durch Northernhybridisierung auf Anwesenheit des Alanin Racemase Transkriptes überprüft (siehe Beispiel 17). Unter Verwendung eines Adapterprimers (5'-GCCACGCGTCGACT(T)₁₇) (Fa. GIBCO BRL) wurde die Erststrangsynthese durchgeführt und anschliessend mit den Primern S 11 (5'-ATTGGGGAGATCCCACTCTC, Pos. 1990 - 2009, (Abbildung 20)) und PRP8/6 (5'-ACCGCAAAGGACTTTGACTTGCCT, Pos. 3145 - 3122, (Abbildung 20)) der entsprechende Bereich amplifiziert, die DNA Fragmente gereinigt, in den Plasmidvektor pGEM-T (Fa. PROMEGA) einkloniert und die DNA verifizierter Klone ebenfalls sequenziert. Auf diese Weise wurde die komplette Sequenz zwischen as1753 und as1751 aus cDNA fertiggestellt. Ein Vergleich gegen die genomische Sequenz zeigte, dass dort bei Pos. 2035 - 2110 ein Intron von 76 bp vorhanden ist.

Isolierte RNA (siehe Beispiel 17) wurde zur Durchführung von 5'-RACE Experimenten unter Verwendung eines Kits (Fa. GIBCO BRL) herangezogen. Als "Ankerprimer" wurde das Oligonukleotid 5'-CUACUACUACUAGGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGG-GIIG verwendet. Als genspezifische Primer wurden S7 (5'-CTCGTCAGCCCAAGCCTT, Pos. 2571 - 2554 (Abbildung 20)) und S10 (5'-ACAACAAACAGAGCTGCTTC, Pos. 2261 - 2243 (Abbildung 20)) eingesetzt. Die erhaltenen Fragmente wurden in den Plasmidvektor pGEM-T (Fa. PROMEGA) einkloniert und sequenziert. Es wurden insgesamt 32 unabhängige Klone charakterisiert. Wie das Ergebnis in Abbildung 21 zeigt, wurden 3 verschiedene Starts gefunden. Wenn man die gesamte Anzahl von 32 Einzelklonen zu einer statistischen Auswertung heranziehen will, so beginnen 75% bei Pos.-8, 16% bei Pos.-14 und 9% bei Pos. 26. Die Positionen beziehen sich auf das postulierte ATG Translationsstartcodon (siehe unten).

Analog dazu wurde auch das Ende des Transkriptes durch 3'-RACE Experimente (Fa. GIBCO BRL) untersucht. Als genspezifischer Primer wurden PRP8/2 (5'-AGGCAAGTCAAAGTCCTTTGCGGT, Pos. 3122 - 3145 (Abbildung 21)) und S13 (5'-CTCAGCACCGTGACATACGC, Pos. 3011 - 3030 (Abbildung 21)) verwendet. Es wurden insgesamt 12 Klone sequenziert, deren 3'-Enden in Abbildung 23 gezeigt sind. Alle

sequenzierten Messenger tragen eine polyA-Tail. Dessen Länge liegt zwischen 16 und 43 Nucleotiden.

In Abbildung 20 ist die Sequenz des Alanin Racemase Gen Bereiches dargestellt. Das erste Methionin Codon des ORF liegt bei Pos. 1953. Es ist dies aber auch zugleich das einzige Met-Codon, das auf dem sequenzierten Transkript in Frage kommt, da bereits 9 Codons später die Teilsequenz als 1753 gefunden wurde. Nach dem Splicing des Introns ergibt sich ein durchgehender offener Leserahmen, der bei Pos. 3178 endet. Er umfasst 383 Codons (Aminosäuresequenz siehe Abbildung 20). Das Molekulargewicht des abgeleiteten Proteins errechnet sich zu 41002 Da.

Die Analyse der Sequenzregion oberhalb des Strukturgens nach Promotorelementen ergab zwei Möglichkeiten. Entweder eine sehr ausgeprägte TATA Region bei ca. -146, deren Abstand von den experimentell gefundenen Transskriptionsstartpunkten etwas gross, aber durchaus noch im üblichen Rahmen ist. Die CAAT-Box bei ca. -200 würde von der Entfernung her auch sehr gut passen. Bei der TATA-Box bei ca. -60 mit dazupassender CAAT-Box bei -121 stimmen auch die Distanzen zu den Transskriptionsstartpunkten (-8, -14, -26) sehr gut mit den Erwartungen überein.

Literaturliste:

Badet B., Roise D. and Walsh C.: Inactivation of the *dadB* *Salmonella typhimurium* alanine racemase by D and L isomers of β -substituted alanines: Kinetics, stoichiometry, active site peptide sequencing, and reaction mechanism. *Biochemistry* 23 (1984) 5188-5194.

Badet B. and Walsh C.: Purification of an alanine racemase from *Streptococcus faecalis* and analysis of its inactivation by (1-Aminoethyl)phosphonic acid enantiomers. *Biochemistry* 24 (1985) 1333-1341.

Cannon P.F.: International Commission on the taxonomy of fungi (ICTF): name changes in fungi of microbiological, industrial and medical importance. Part 2. *Microbiological Sciences* 3 Nr.9 (1986) 285-287.

Cathala G., Savouret J.F., Mendez B., West B.L., Kavin M., Martial J. and Baxter J.D.: A method for isolation of intact translationally active ribonucleic acid. *DNA* 2 (1983) 329-335.

Chomczynski P. and Sacchi N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.* 162 (1987) 156-159.

Cryer D.R., Eccleshall R. and Marmur J.: Isolation of yeast DNA. *Method in Cell Biology* XII (1975) 39-44.

Dreyfuss M., Härrä E., Hofmann H., Kobel H., Pache W. and Tschertter H.: Cyclosporin A and C. *European J. Appl. Microbiology* 3 (1976), S. 125-133.

Evans G.A., Lewis K. and Rothenberg B.E.: High efficiency vectors for cosmid microcloning and genomic analysis. *Gene* 79 (1989) 9 - 20.

Gurr S.J., Unkles S.E. and Kinghorn J.: The structure and organization of nuclear genes of filamentous fungi. In: Kinghorn J.R. (Ed.): *Gene structure in eukaryotic microbes*. IRL Press, Oxford 1987.

Esaki N. and Walsh C.: Biosynthetic alanine racemase of *Salmonella typhimurium*: Purification and characterization of the enzyme encoded by the *alr* gene. *Biochemistry* 25 (1986) 3261-3267.

Ferrari E., Henner D.J. and Yang M.Y.: Isolation of an alanine racemase gene from *Bacillus subtilis* and its use for plasmid maintenance in *B.subtilis*. *Biotechnology* 3 (1985) 1003-1007.

Galakatos N.G., Daub E., Botstein D. and Walsh C.: Biosynthetic *alr* alanine racemase from *Salmonella typhimurium*: DNA and protein sequence determination. *Biochemistry* 25 (1986) 3255-3260.

Holland J.P. and Holland M.J.: Structural comparison of two nontandemly repeated yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes. *J.Biol.Chem.* 255 (1980) 2596-2605.

Hynes M.J., Corrick C.M. and King J.A.: Isolation of genomic clones containing the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans* and their use in the analysis of structural and regulatory mutations. *Molec.Cell.Biol.* 3 (1983) 1430-1439.

Inagaki K., Tanizawa K., Badet B., Walsh C., Tanaka H. and Soda K.: Thermostable alanine racemase from *Bacillus stearothermophilus*: Molecular cloning of the gene, enzyme purification, and characterization. *Biochemistry* 25 (1986) 3268-3274.

Inagaki K., Tanizawa K., Tanaka H. and Soda K.: Purification and characterization of amino acid racemase with very broad substrate specificity from *Aeromonas caviae*. *Agric. Biol. Chem.* 51 (1987) 173-180.

Kimura H., Sumino Y. and Suzuki M.: Cloning and sequencing of the putative glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from *Cephalosporium acremonium* and its application to heterologous gene expression. *J.Ferment.Bioeng.* 71 (1991) 145-150.

Kleinkauf H. and v. Döhren H.: Nonribosomal biosynthesis of peptide antibiotics. *Eur. J. Biochem.* 192 (1990) 1-15.

Kück U., Walz M., Mohr G. and Mracek M.: The 5'-sequence of the isopenicillin N-synthetase gene (*pcbC*) from *Cephalosporium acremonium* directs the expression of the prokaryotic hygromycin B phosphotransferase gene (*hph*) in *Aspergillus niger*. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 31 (1989) 358-365.

Lämmli U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970) 680-685.

Lawen A., Traber R., Geyl D., Zocher R. and Kleinkauf H.: Cell-free biosynthesis of new cyclosporins. *J. Antibiotics* 42 (1989) 1283-1289.

Lawen A., Dittmann J., Schmidt B., Riesner, D. and Kleinkauf H.: Enzymatic biosynthesis of cyclosporin A and analogues. *Biochimie* 74 (1992) 511-516.

Lawen A. and Zocher R.: Cyclosporin Synthetase. The most complex peptide synthesizing multienzyme polypeptide so far described. *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 11355-11360.

Maniatis T., Fritsch E.F. and Sambrook J.: Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor 1982.

Maxam A.M., and Gilbert W.: Sequencing end-labelled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods in Enzymology* 65 (1980) 499-560.

Mohr, G.: Grundlagen, Anwendungen und Möglichkeiten der Stammverbesserung biotechnologisch relevanter Hyphenpilze durch die Gentechnik: Integrative Transformation von *Aspergillus niger*. Dissertation Ruhr-Universität Bochum (1988).

Peberdy J.F.: Fungal Protoplasts. In: Bennett J.W. and Lasure L.L. (Eds): More gene manipulations in fungi. Acad.Press Inc., San Diego, 1991.

Pfützner A.: Klonierung zweier Glykolysegene aus *Penicillium chrysogenum*. Dissertation Technische Universität Wien (1989).

Punt P.J., Dingemanse M.A., Jacobs-Meijsing B.J.M., Pouwels P.H. and van den Hondel C.A.M.J.J.: Isolation and characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene of *Aspergillus nidulans*. *Gene* 69 (1988) 49-57.

Roise D., Soda K., Yagi T. and Walsh C.: Inactivation of the *Pseudomonas striata* broad specificity amino acid racemase by D and L isomers of β -substituted alanines: Kinetics, stoichiometry, active site peptide, and mechanistic studies. *Biochemistry* 23 (1984) 5195-5201.

Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T.: Molecular Cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989.

Sanger F., Nickler S. and Coulson A.R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 74 (1977) 5463-5467.

Schmidt B., Riesner D., Lawen A. and Kleinkauf H.: Cyclosporin synthetase is a 1.4 MDa multienzyme polypeptide. *FEBS Letters* 307 (1992) 355-360.

Staben C., Jensen B., Singer M., Pollock J., Schechtman M., Kinsey J. and Selker E.: Use of a bacterial Hygromycin B resistance gene as a dominant selectable marker in *Neurospora crassa* transformation. *Fungal Genetics Newsletter* 36 (1989) 79.

Tanizawa K., Ohshima A., Scheidegger A., Inagaki K., Tanaka H. and Soda K.: Thermostable alanine racemase from *Bacillus stearothermophilus*: DNA and protein sequence determination and secondary structure prediction. *Biochemistry* 27 (1988) 1311-1316.

Thornberry N.A., Bull H.G., Taub D., Greenlee W.J., Patchett A.A. and Cordes E.H.: 3-Halovinylglycines. Efficient irreversible inhibitors of *E. coli* alanine racemase. *J. Am.*

Chem. Soc. 109 (1987) 7543-7544.

Walsh C., Badet R., Daub E., Esaki N. and Galakatos N.: Bacterial alanine racemases: Targets for antibacterial agents. Spec. Publ. - R. Soc. Chem. 55 (1985) 193-209.

Wang E. and Walsh C.: Suicide Substrates for the alanine racemase of *Escherichia coli* B. Biochemistry 17 (1978) 1313-1321.

Wartburg A. v. and Traber R. Chemistry of the natural cyclosporin metabolites, in: Cyclosporin (Borel J.F., ed., series Progress in Allergy, Ishizaka K., Lachmann P.J., Kallós P. and Waksman B.H., eds.), Karger Verlag 1986, 28-45.

Wasserman S.A., Daub E., Grisafi P., Botstein D. and Walsh C.: Catabolic alanine racemase from *Salmonella typhimurium*: DNA sequence, enzyme purification, and characterization. Biochemistry 23 (1984) 5182-5187.

Wood W.I., Gitschier J., Lasky L.A. and Lawn R.M.: Base composition-independent hybridization in tetramethylammonium chloride: A method for oligonucleotide screening of highly complex libraries. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 82 (1985) 1585.

Der Inhalt der zitierten Literaturstellen wird der Anmeldung hiermit als Referenz eingefügt.

Verwendete Abkürzungen:

μCi	Mikrocurie
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
<i>amdS</i>	Acetamidasegen
ACV	Aminoadipyl-Cysteinyl-Valin
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
as	Aminosäuren, Aminosäuresequenz
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DAO	D-Aminosäure Oxidase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTE	Dithioerythrit
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Aethylendiamintetraessigsäure
FIGE	Feldinversionsgelelektrophorese
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
g	Gramm
(g/v)%	Gewicht/Volumen in %
gv%	Gewicht/Volumen in %
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
GBq	Giga-Bequerel
<i>gpdA</i>	Gen für die GAPDH
h	Stunden
HEPES	N-2-Hydroxyethyl-piperazine-N-2-propansulfonsäure
HP-RPC	High Pressure - Reversed Phase Chromatography
kb	Kilobase; 1000 Nukleotide
kDa	Kilodalton
l	Liter
LDH	Lactat-Dehydrogenase
MBq	Mega-Bequerel
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter

mM	Millimolar
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
M _r	relative Molmasse
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
mU	milli-units
NADH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid, reduziert
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PEG	Polyethylenglykol
pfu	plaquebildende Einheiten
pH	pH-Wert
Pos	Position
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
sek	Sekunden
SSC	150 mM NaCl, 15 mM Natriumzitat, pH 7,0
SSPE	180 mM NaCl, 10 mM Natriumphosphat, 1 mM EDTA, pH 7,7
TE	10 mM Tris-Cl pH 7.5, 1 mM EDTA
TM	mittlerer Schmelzbereich
Tricin	N-tris(hydroxymethyl)methylglycine
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volumen
(v/v)%	Volumen Prozent
°C	Grad Celsius

Außerdem wurden die für Restriktionsendonukleasen üblichen Abkürzungen verwendet (*Sau3A*, *HindIII*, *EcoRI*, *HindIII*, *ClaI*,...; Maniatis et al., 1982). Für DNA-Sequenzen wurden die Nukleotid-Abkürzungen A, T, C, G und für Polypeptide die Aminosäure-Abkürzungen (Arg, Asn, Asp, Cys,...; b.z.w. R, N, D, C, ...) benutzt (Sambrook et al., 1989).

Ansprüche:

1. Isolierte oder rekombinante Nukleotid-Sequenz die für ein eukaryontisches Enzym, oder ein Fragment davon kodiert, das Alanin-Racemase Aktivität besitzt.
2. Isolierte oder rekombinante Nukleotid-Sequenz gemäss Anspruch 1, die für Alanin Racemase aus Tolypocladium niveum ATCC 34921 kodiert oder für ein Enzym kodiert, das Alanin Racemase Aktivität besitzt und zu mindestens 70% hierzu homolog ist.
3. Isolierte oder rekombinante Nukleotid-Sequenz gemäss Anspruch 1 oder Anspruch 2, die eine Restriktionskarte besitzt, wie in Abbildung 6 dargestellt wird.
4. Isolierte oder rekombinante Nukleotid-Sequenz gemäss Anspruch 3, die entweder die komplette Nukleotid-Sequenz, wie in Abbildung 5 dargestellt, oder ein Fragment hiervon, das Alanin Racemase Aktivität besitzt, umfasst.
5. Isolierte Nukleotid-Sequenz, die zu einer Nukleotid-Sequenz gemäss Anspruch 4 hybridisiert.
6. Nukleotid-Molekül enthaltend eine isolierte Nukleotid Sequenz gemäss einem der Ansprüche 1 bis 5.
7. Vektor enthaltend eine isolierte Nukleotid Sequenz gemäss einem der Ansprüche 1 bis 6.
8. Vektor gemäss Anspruch 7 in Form eines Plasmids, eines Cosmids, eines P1-Vektors oder eines YAC-Vektors.
9. Wirtszelle die einen Vektor gemäss einem der Ansprüche 7 oder 8 trägt.
10. Verfahren zur Herstellung von Alanin Racemase, durch Züchtung einer Wirtszelle gemäss Anspruch 9 und Veranlassung der Wirtszelle, Alanin Racemase zu exprimieren.
11. Alanin Racemase hergestellt mittels eines Verfahrens gemäss Anspruch 10.
12. Verfahren zur Herstellung eines Cyclosporin Derivats, das in Stellung 8 eine ausgewählte Aminosäure enthält, die anders ist, als D-Alanin, durch
 - Entaktivierung jenes Teils der genomischen DNA eines Cyclosporin-produzierenden Wirtes, der für Alanin Racemase kodiert
 - Züchtung des Cyclosporin-produzierenden Wirtes in einer Fermentationsbrühe, die die ausgewählte Aminosäure enthält und

-gegebenenfalls Veranlassung des Cyclosporin-produzierenden Wirtes, das Cyclosporin Derivat herzustellen.

13. Verfahren zur Herstellung eines Cyclosporin Derivats, das in Stellung 8 eine ausgewählte Aminosäure enthält, die anders ist, als D-Alanin, durch
 - Transformierung eines Cyclosporin-produzierenden Wirtes mit einem Vektor, der die Biosynthese der angewählten Aminosäure bewirkt
 - gegebenenfalls Entaktivierung jenes Teils der genomischen DNA eines Cyclosporin-produzierenden Wirtes, der für Alanin Racemase kodiert
 - Züchtung des Cyclosporin-produzierenden Wirtes unter Veranlassung, die ausgewählte Aminosäure und das Cyclosporinderivat herzustellen.
14. Verfahren zur Verbesserung der Herstellung eines Cyclosporins durch
 - Transformierung eines Cyclosporin-produzierenden Wirtes mit einem Vektor gemäss Anspruch 7 oder 8 und
 - Veranlassung der Wirtszelle, Alanin Racemase zu exprimieren.
15. Isolierte DNA aus *Tolypocladium niveum*, die für das Enzym Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase kodiert und gegebenenfalls den Promotorbereich und/oder den Terminationsbereich des Gens enthält.
16. Isolierte DNA nach Anspruch 15, welche die gesamte oder auch nur Teile folgender Sequenz (kodierender Strang) aufweist:

```

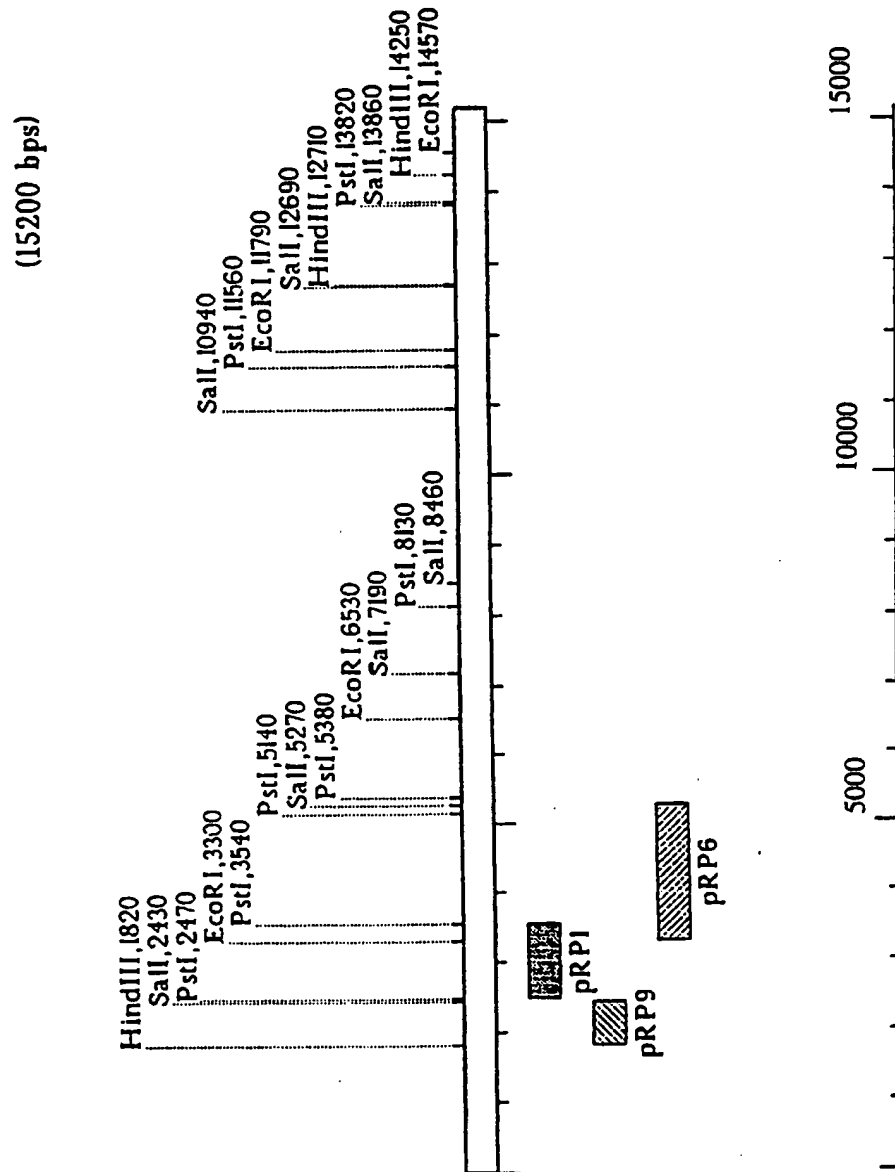
1  CTCGAGAACATTTCGTTGTGCACCGTGCTGGAGCTACCGATGGGGTTGTCGTTAGCGGGAC
61  AACCTTGTTGGAGTGGTGAGATCACCCGCTGTGGCTTCAACCACTGGGAGCTGCGGGCAG
121  CGGCGTGCCGCGAGAGGGTTGGACAGCGTCGCACAGGTGCCACCGCGTGGTCAAGGAAG
181  GCCAGGTGCGCCCTTCTGCTGCTGGTCCCAAAAATAGTCCAATGCAATATGTGCCTCATCC
241  GATGCCGCCTTGGTGTTTTAGGTGCTGACGTGCCGTCCATGTTTCGTAGCAGGTCTACGGA
301  GTACTCCAGCAAGTCCAGGTAGGCAAAGGTAATTATGTAACCTAGGTGCTACGTAAGGGA
361  GTCGCAATATCCATCCGTCGCGCCTCCCCCTCCTCGGAGCTGCCACCCACGCCTCCATGCT
421  AGTTAGGAGGTACCTACATATTATTTTTCCCTGTCCCTCCCTCCCTCCGTCCTTTCTCT
481  TCCTTTTCCTCCTCCCATACCAACCCCTCACGAGAACCTCATCCTCGCTATCCAGTCCC
541  AACCTTCCGGTACGTACGCGACGCAGCTTTCGCCCTGGACGGGCGAGAGCTCCTCTTGCC
601  CCGCCTGCGAAGCTTGCTTGCCCTCTGCCGCTCCGGCGTCAAGCTCCCCCGCTAACTCC
661  GCAGCGTACAAAATGGCTCCCATCAAGGTCGGCATCAACGGCTTCGGTCGCATTGGCCGT
721  ATCGTCTTCCGCAACGCCGTCGAGCACCCCGATATCCAGGTTCGTGCGCGTCAATGACCCC
781  TTCATCGAGACCAAATACGCTGTGAGTTTTTGCCGGTTGCTGCTGCCCCCTCCCCCTCCCC
841  CTCCTTGACCATCCTTGCCCCCTCCTTTTGGCCGCAATCGCCCCCAACACGCCTCAACAAC
901  ACCACCGTCACCCGCGGTCATGGAATTTCTGGCCACGCTATGCTGCCCCCTCCATGATA
961  TCATCAATGAGCGACGCACCACCAGCTTACAATTGCTCGTGGTGGCTCTATTCAATTC

```

1021 GTGAGAGATGCAACGGCATTGCAGCATTGCCAGCAGTTCCTCCCCGCTCCATTGATGCGG
1081 CCAAGGCGCCTGGCCCAGTCTTGCTTTCTCATGTCAAGCAGACGGGGAACCGCCATAAAT
1141 CACAATCTCATCAGCCAATTCACCACATCTATGCTTTCCGCGCAGTATGCTGACCTCCGT
1201 CTCTTCTCCACGCCATAGGAGTACATGCTCAAGTATGACTCCTCCACGGTAACTTCAAG
1261 GCGGACATCGCCGTCGACGGCAACGACCTGGTTGTCAACGGCAGCAAGGTCAAGTTCTAC
1321 TCCGAGCGCGACCCCGCCGCCATCCCCTGGAAGGACACTGGCGCCGACTACATCGTCGAG
1381 TCCACTGGTGTCTTACCACCACCGACAAGGCCAAGGCTCACTTGGTTGGCGGTGCCAAG
1441 AAGGTCATCATCTCGGCTCCCTCTGCCGATGCCCCCATGTACGTAATGGGCGTCAACGAG
1501 AAGACCTACGACGGCAAGGCCGATGTCTATCTCCAACGCCTCGTGCAACCACTGCCTG
1561 GCTCCCCTCGCCAAGGTCATCCACGACAAGTTCACCATTGTTGAGGGTCTTATGACCACC
1621 GTCCACTCCTACACCGCCACCCAGAAGACCGTTGACGGCCCCCTCCGGCAAGGACTGGCGC
1681 GGTGGCCGTGGTGTCTGCCCCAGAATCATCCCCAGCAGCACTGGCGCCGCCAAGGCCGTG
1741 GGCAAGGTCATCCCCGACCTCAACGGCAAGCTACCGGCATGTCCATGCGTGTGCCACT
1801 GCCAACGTCTCCGTGCTTGACCTGACTGTCCGACCGAGAAGCCCGCCAGCTACGAGGCC
1861 ATCAAGGCGGCCATCAAGGAAGCCGCCAACGGTCCCCTCAAGGGCATCCTCGCCTACACC
1921 GAGGACGACATCGTCTCCAGCGACATGAACGGCAACACCAACTCCTCCATCTTCGATGCC
1981 AAGGCCGGCATCTCCCTCAACGACCACTTCGCCAAGCTGGTCTCCTGGTACGACAACGAG
2041 TGGGGCTACTCCCGCCGTGTCTCGACCTCCTGGCCTACATTGCCAAGGTTGATGCTGGC
2101 AAGTAAATGCTGCCTATTGCAGGAAAGCCAGTAGGGCGAAAAGTGGTTGGTGGCTAGTGG
2161 CCGAGAGACTGAATCAATATGAAATGCTCGCACCTATTTTCGGTCGAGAAATTATCAGTA
2221 CTCGGAAGAACACACATTCAAGTACATCCTCCGGGGGTGGAGCAGTGGAATATGTTCCC
2281 CGGAGCAATGGTTTAGTGTAGCCATGGAGAATAGACACGCCCCGTCCATCCACATGTACTG
2341 TGTCCCGTCGCATGAAAGCGCTCTGTGACATGAGTCAAGCACGTATTCAATTGCATCGTTT
2401 CATGTTTCATGTTTTGCCATTTTCATCTGAGCTAGGTATCTAACCTGTGAACCTCGCGTGA
2461 ATGCCCCGCCGTCTGGCCATTTGACCTTTGACGCCAGAACACCAGCTCAGGCTCTGACT
2521 GTGCATGTATAAGCAAGTAGCGGCCGTGCTCCGCTTTTCTGTAGATCTGGTCATTATAG
2581 ACGATCCATTACCGGTCTCGCGATTATGATCCATCCTGCTCGTGTGTTGATCGATGCG
2641 TCGGGAACAATAAAAGAGGCGATTGTCAAAAATAGAGTCGATAATAAGCCGGCGAAGAG
2701 AAGAAGACCCAAAATCCTCTAGGTAGGAGAAAAAAGAAAACGGAAAAAGAGAAAGTATT
2761 TGTCTGTCTCGGCCGGCAGTGCCTGCTGGGCCGAGGGGGTGGGATATCATCACGTACATG
2821 TACAACAAAACGGGAACAACAGAAAAAGAAGAGCTC

17. Rekombinantes DNA-Molekül, das DNA nach den Ansprüchen 15 oder 16 enthält.
18. Pilz, der mit einem rekombinanten DNA-Molekül nach Anspruch 16 oder eines Fragments hiervon transformiert wurden.

Abbildung 1



Lambda RAC4

Abbildung 2

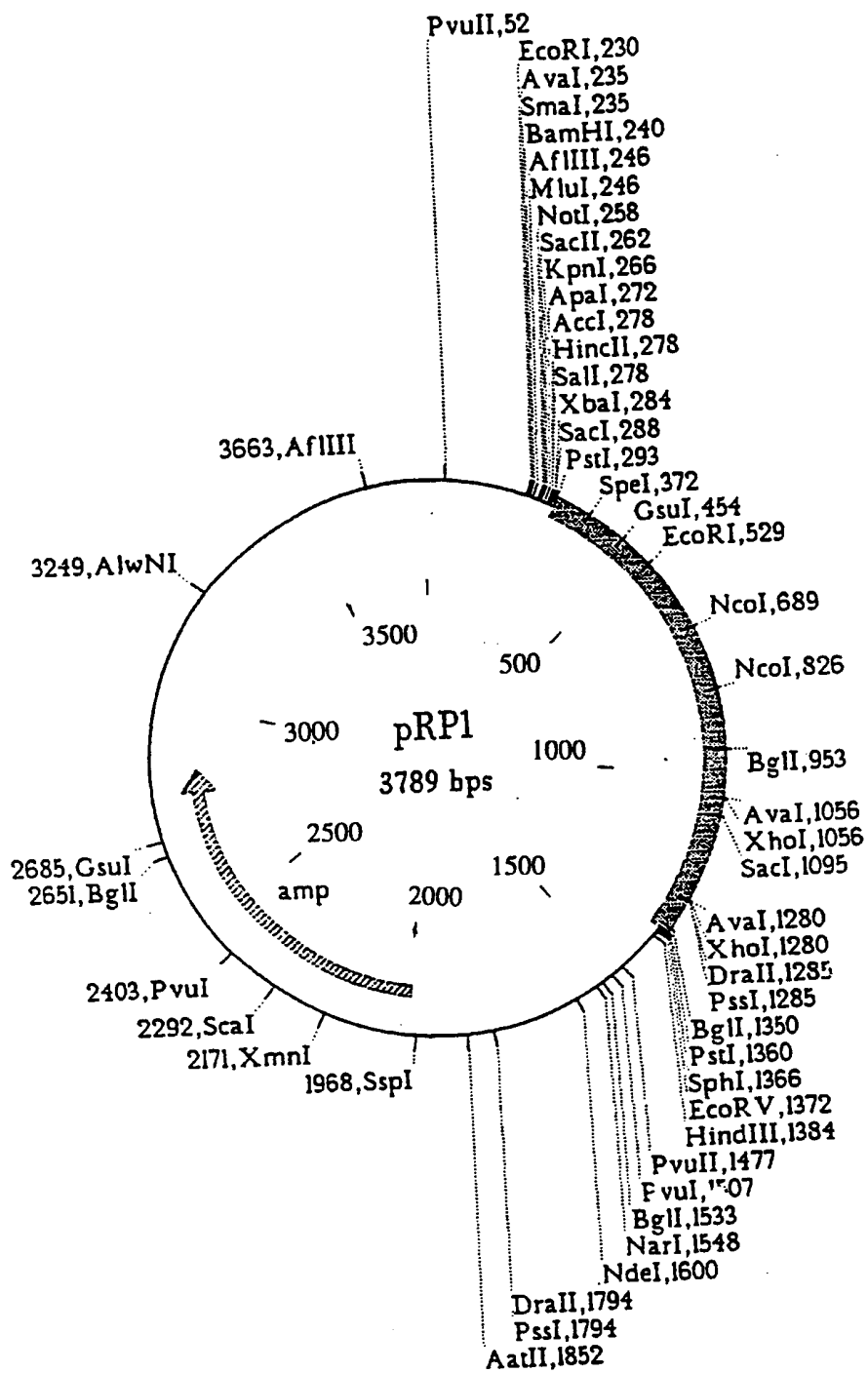
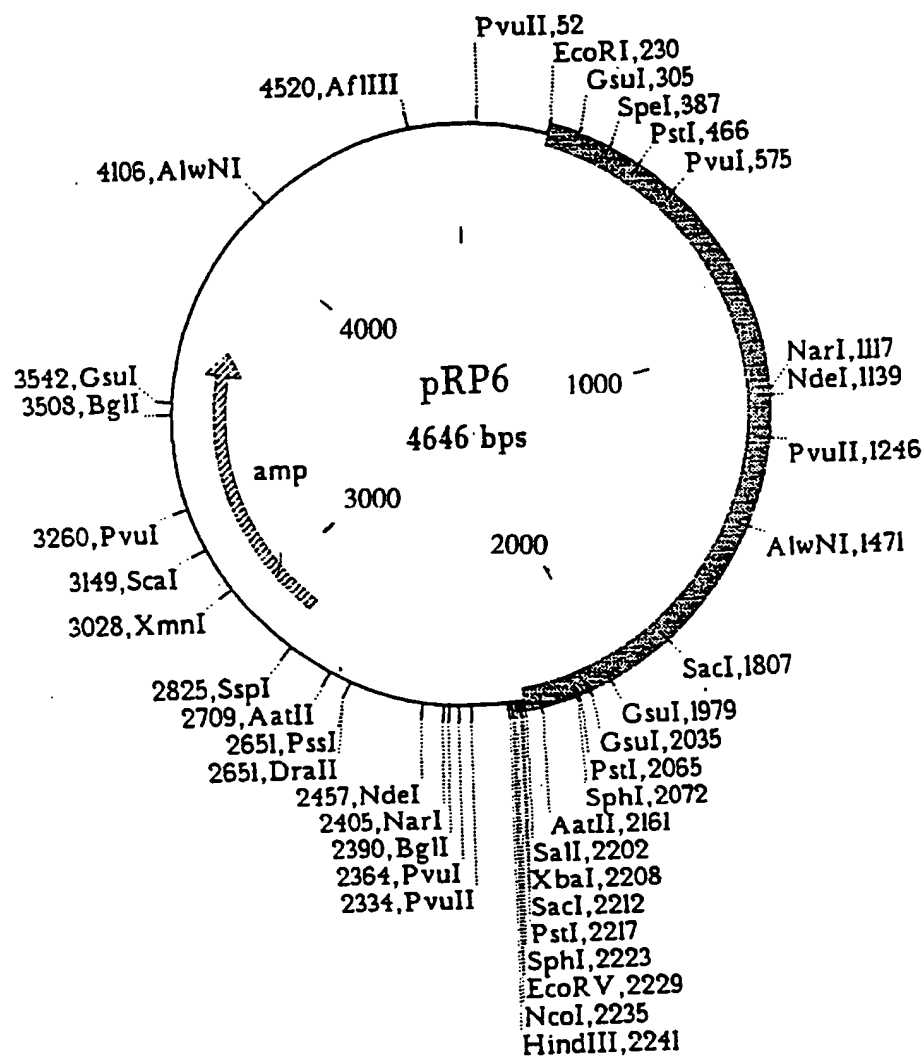
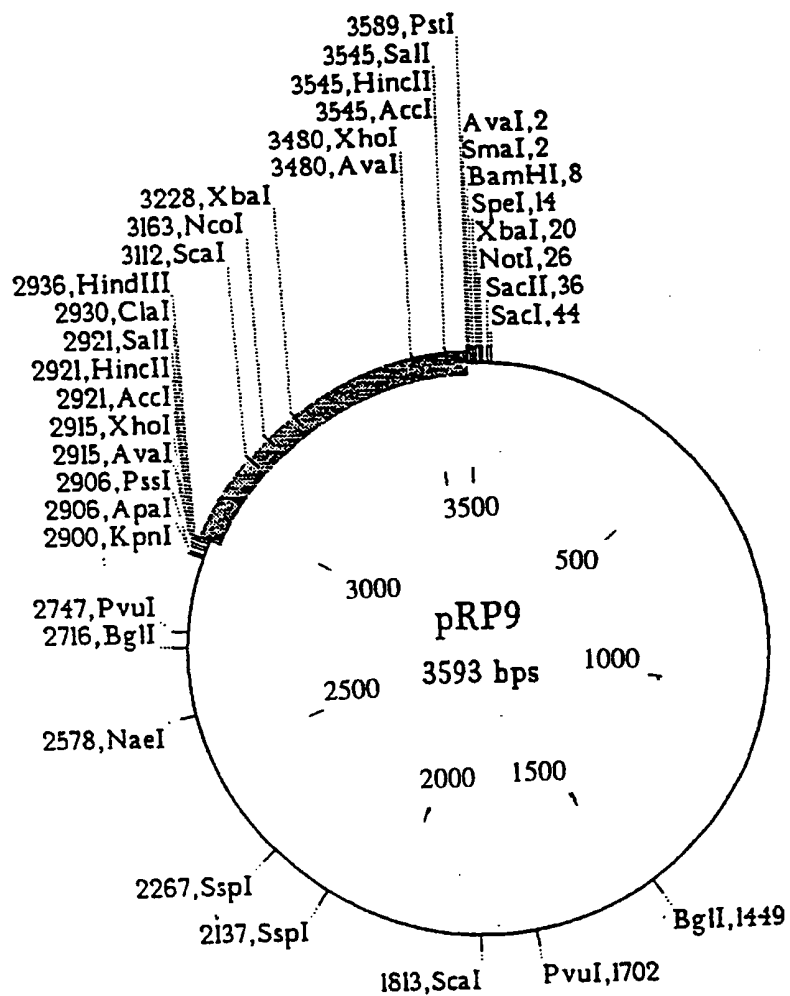


Abbildung 3



4/29

Abbildung 4



5/29

Abbildung 5/1

SalI

1 GTCGACCCGGGCAGCAACGCAGACACGATGCGCTCAAAGGGGACGTCGCGGTTGGCATGT
61 GCCTCTGTCATGACGGACATGATCTGCCCGCAGCACC GACTCGAAGGTGTCGTCTCGTCG
121 AGCACGACTCGCATGCACTGCAGAGTGGCCAAGGGAGCCACCATGTTCTCCAGCTCCGGC
181 CGGTCGCGGTTGGCAACGGGCGCTCCGATGGTTGCATCCTCGGCTCCAGTGAGGGCAAAG
241 TCGGCCACGCGAAACGCTGCCAGCAGCACGGCGTAGGCGGTTACTTGCTGGGAGCGGCAG
301 AAGGCCAGGAGTTCTTTGTGTACCGATCCATCGATCTGGAAGGAGATCTTGCCAGTTTCG
361 CCAGATGGGATAGCTGGCCGGGGAAGCTCTGTGAGGAGCTCGGCCGGTGTGTTGTTATCG
421 AGCTGCTCGATCCAGTATCCGAGCTGCCTTTCCTGCTCAGCGACCTGCTCGTCTCGGTTTC
481 TGCCAAGTCGTCAAGTCACGGTATTGAATGGGAATTGGACCCAAGGGACAAGCCGAAATC
541 GATTTCCCTGCGAGGCGGCCGTGTAGAGTTCTCCAAGCTCCTGCTGAATAATGTCGAGA
601 GACCGGCTGTCTGAGATGATATGGTGTACAACAATGGAAGAATATGGTGATCCTCGGCC
661 ACCTTCAACAATGCAACTCTCCAAGCTGGCTCAGACTCTAGGTCGAAC TTCATGGTTTGT
721 TCCTCTGCCAGGAGCTGGGCCAAATCGCGGCTCGAGGCATCAACAATCCTCAACCCTCTT
781 TCGAGGCCCGAGGCGTGACAACTGTACGCCCACGCCATCCTGCTCCTTGAACGTCGTT
841 CGGAGCGTCTCGTGGCGCTGCGTCAGAGCGCGGAGGCAGCGTTCAGCGCATCGATGTCTG
901 AGATGGCCCCGAAGTCGGATCGCGGCCGGCGTAATGTCCCAGCTCGCACCAGGCTTCAGC
961 TGGTGCAGGAACCACAGTCTGCCCTGGGCAAAGGATTGCTCGACAGGTTCCGAGTATCGG
1021 TTCGAAGAGATGGAACTCGCCCCGAGACGGGTTGGCAAGGCGATCATATGCCATGTCTTGC
1081 CCGATGGCGCCCATGTTGACCAAGAAAGCAAAAGGCTCTATAATCTGGCAATGGTTGTCT
1141 ATCTGTTAGTAAACCTAGTGTAGTCAGTATGTACAATCCATCTCATGAAGTTCGTGTAGC
1201 TGCTGTAGTTTGCGATTTTGAATGGCTAGTTGCTGAGTTGTGGCGAGTCCGGCTTTGTGC
1261 TGCTACCACAGGTGTAAGTGGCTCGTAGGTCGAGCTTTCCGACAGTATCGTTGCACGGCA

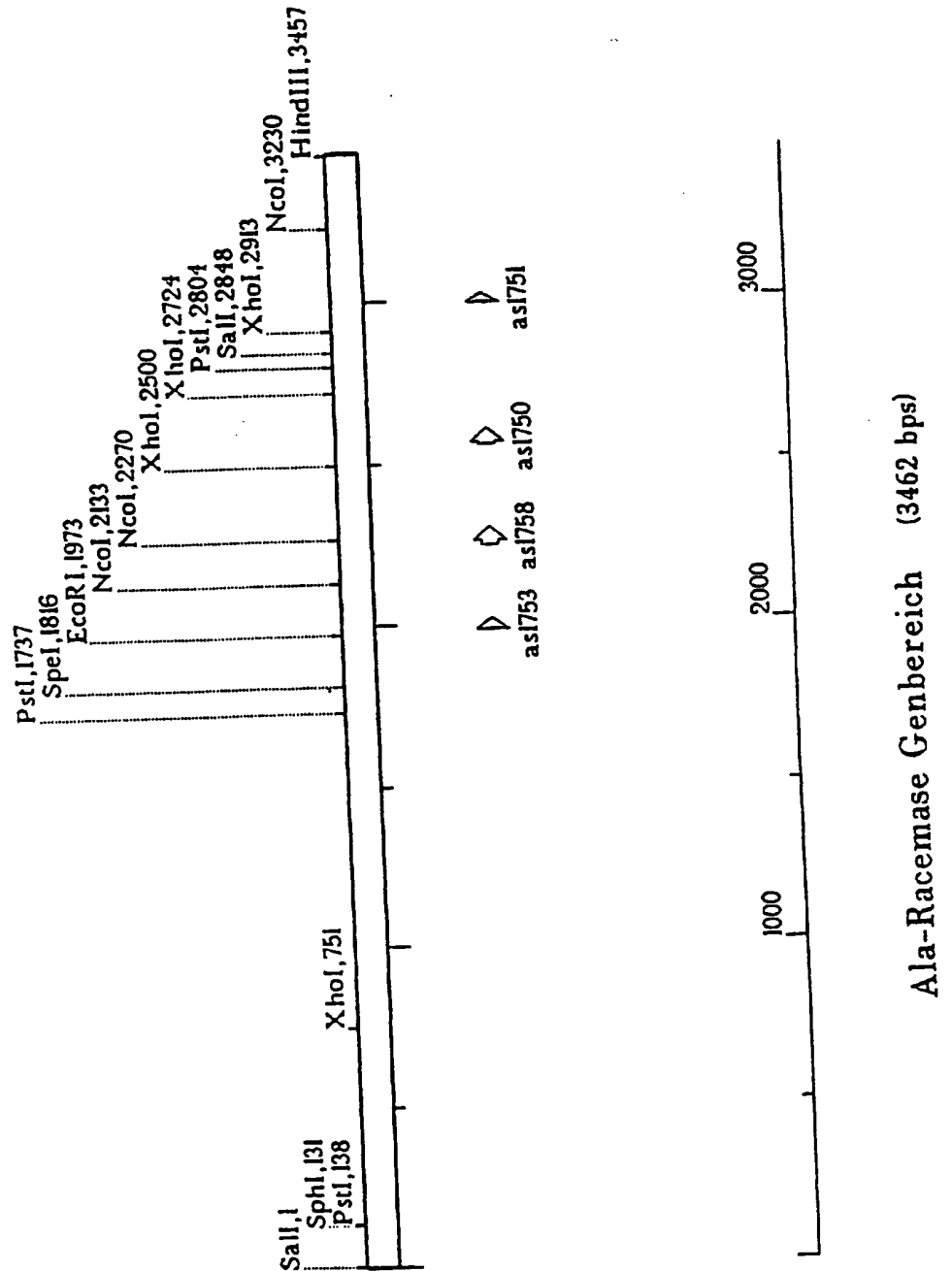
Abbildung 5/2

1321 CAGAAAGCAAGTAGCTATTTGTGTCCGATAAAGAGTGGATCTCCTGAGTTTTTGTGGTG
1381 CTTTTTCTTTTCCAAATTCGAGGAGATGTTCCAGTAAATAGTAAGCGACTGAAGGAAC
1441 TGAGTTCAGTTCGTGGTCAGTAGATGGAGACTTGTAAGGTAATCTGACAGCCAAGGGGAT
1501 TGCCCTCCTCGGGGTTCCACATATCCAAGCTATGATACTACTCCTTTACTCCGTATTAC
1561 CTTGTTAATAATCCCTGAAGGGTTCGAACTTCGTCAGACTGTGGACCACGTGGCTTACA
1621 CCCCCACGATCGACGTACGAGTATCGGTACCTTAAAACAAGCATAGAGTTACTAATAGA
1681 ATAAGTACCTATACTCATCAGCAAACAATATCCCTCCATCAAGATCGAGGCATTGCTGC
1741 AGCCTGCCCATCGCAATAGATCCTCTGACATTAACAGAAGAGAGTACCTACGCATATAAA
1801 CTACTATATAAAAATACTAGTAGCGGTTAAGCCAATAAGAACGTTGTCGTGGGGCTTGT
1861 ACATCGGCGGGATTTGTGATGCTAGAAGGGTGTATATCTGGAGGCCATCCCAGCCGATT
1921 TCCTGCATTCTCTCGCTAGATTCACATCACCATGAAGATTTGCCCGATACTGAATTCCA
1981 AGGCAGGTCATTGGGGAGATCCCCTCTCACTGGCTCAGCCTTTGATTTAGGAGTAAGT
2041 TATCAAATCGATTCCTTGTCCTATCCTATCCTTCCCTGTTACCGGAGCTGACAGCTATCT
2101 GATATTGTAGGCGACGCTATTACTACACCATCCCATGGAATGCTGGAAGCAATCGCCGGG
2161 GCCACGCTCAATGATGATGTCTATGGCGAGGACCAGCTAACACGGTCCTTCGAGGAGCAC
2221 ATGGCGAGCATCTGTGGCAAAGAAGCAGCTCTGTTTGTGTGTCCGGGACCATGGCCAAC
2281 CAGATTGCCTTAGGAGCGCTGTCACGACGATGCACAGGTGTACTAGCAGATGCTACCTCT
2341 CATATCGTACATTTTGAGGCCGGTGGCCTTGCCGGTCTCTCCGGGCATCCATCCAGCCC
2401 GTGCGGCCGGGAATGGGCATTATCTCACCTTGATGATGTGGAACGACACGAGTGACC
2461 ACCAACATGATAGAACGGTTGCCACACGATCATCAGCCTCGAGAACACAGCTCACGGC
2521 AGCGTAATCCCACTACAAGAGCTCCGCAAGATGAAGGCTTGGGCTGACGAGCAGGAGATC
2581 GCCATTACATCGACGGTGC GCGGATATGGCACGCCGTGGCAGGCGGGGGCGGTAGTCTA

Abbildung 5/3

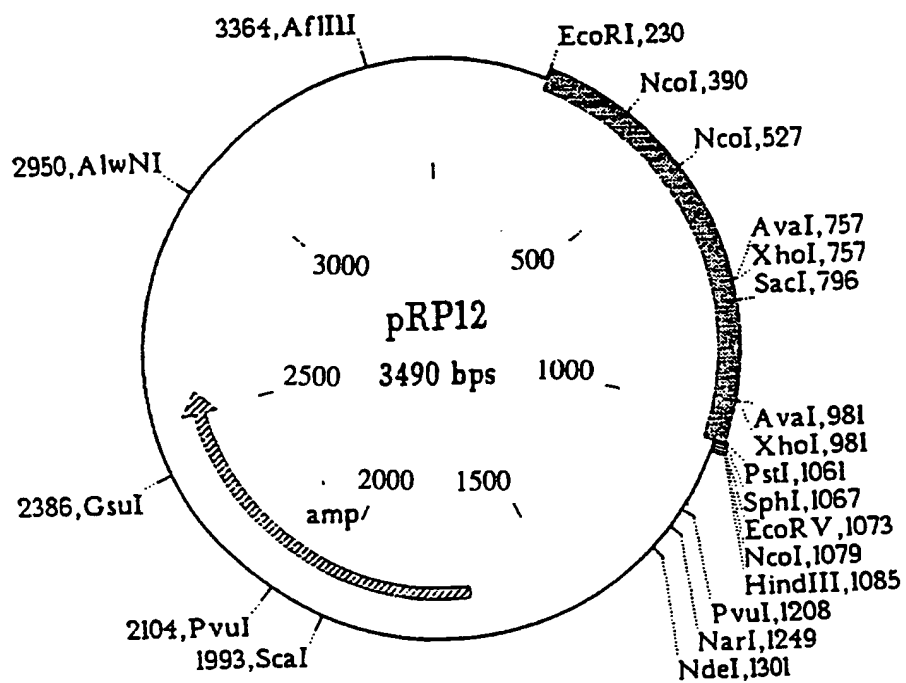
2641 AAGGAGATCGCGGGCTGCTGCGACGCGATGACCCCTCTCCTTCGGTAAAGGGCTCGCAGCA
2701 CCGATAGGATCGGCCATCGTGGGCTCGAGGGACCTTATAGCAAGGGCGAGAAGACTGCGC
PstI
2761 CAAAGCATCGGCGGGCGGCTCCGCAAGGCTGGGGCCATTGTGGCTGCAGCTTGGCAGGCC
SalI
2821 ATGATAGAGAACTTTGGTCCCGGCGATGTCGACACACGGGGCATCATCCAGAGAACACAT
2881 GTGTTGGCGAGAGCGGTGGCCAACATGTGGACCTCGAGGGGCGGTCTGCTTCTTCGCCCCG
2941 GTGATGACGAACCTTGTCTGGCTCGACTTGAAGAGCGCTGGTCTCGACAAGTCCACACTG
3001 GACACGGCTGCTCAGCACCGTGACATACGCATCAGGGCACCACGCATCGTTCTGCATCAC
3061 CAGATATCAACCGATGCTATGCGACGACTGGAGGCGGTGTTTCGAGGAGGTGTTAGAGAAA
3121 AAGGCAAGTCAAAGTCCTTTGCGGTCAAGAGCGGAGCGAGCAGGTCTAGAACGCCTTTAG
3181 TCAAATAACTGGATACCCGGAGTGGGGTCATTGCTGTTGGGCCATATTCCATGGATCAA
3241 GGAGGTACTGACTATCTAAGGTTGCTGTCAGGGGTTCGAAGTACTCAAGGGAGGGAAAA
3301 GGGTAGAGGATAGATAGGCAAGACCTGAGCACATGTGGTATTTTCATCCATCCTTCAATGC
3361 CCTTGGTTGTGGGCAAGATCGGCTACCTATGACCCACAAGCATCGAGTCGAGTGTGTTGT
3421 TTCTATTTTGTAGTCACTGGTGTCTCCATCGGGCCAGGAAGCTTAGACCATCGCGCCACGAG
3481 ACATGATCCGTGCTTGACAGCATATCGCCCTAAATCAGCAAGCCCCGAAAATGAATCCA
3541 TCACTCTTTGTTTGTCTCTTTGGTCGCGGAATAATCGCCCCGTGGAACATCACTGGTC
3601 TGGAATCGACGAGAGTCAACCGCAGAGTAGACACGATGGTTCATTCCACAACAGAACAGA
3661 GCCCCCTCCACGGATGGCCAGTTCGCGCAACCCTTGAGACATGTGCGCAGCGAGGTGTTTCT
3721 TTAGGTCCAACACCATCGACTACGAGTAGTTGTATGAATGTATCTATTTTTTTTGGCCG
3781 TTATCCTTTCCCGGACTTGTATGATCTGTGACTGGCATAGCATCCCTGCCGCCGGGGACC
3841 TAGCCCGGCGCCTCATCCGCCTTGCCAGACGGAATGAATAGTCATCTGCACGAGGGGTAG
3901 TGAGCGCTCAGGAATAGGACGATCCGTTAAGCACAAGATGGATTAAACTGTGTTGTGCT
3961 TCGGCGGACCCCTT

Abbildung 6



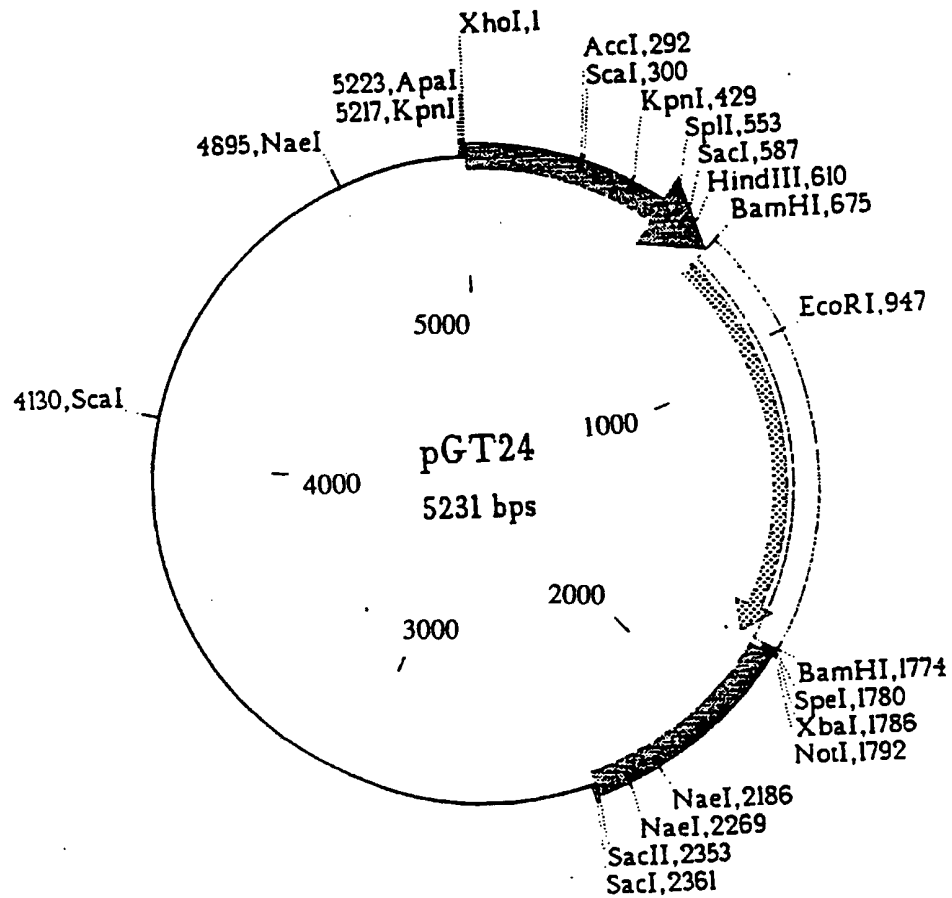
9/29

Abbildung 7



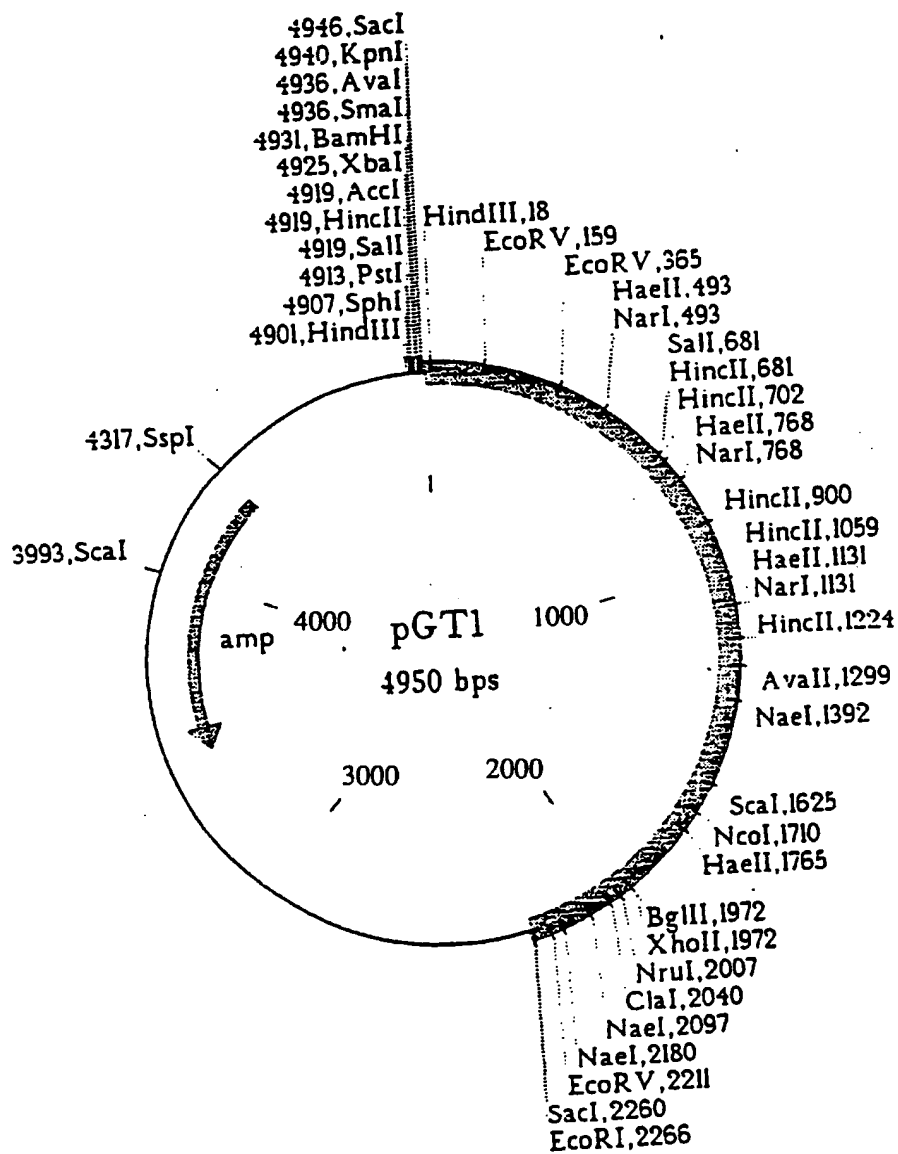
10/29

Abbildung 8



11/29

Abbildung 9



12/29

Abbildung 10/1

SacI

1 GAGCTCCTCTTGCCCCGCTGCGAAGCTTGCTTGCCCTCTGCCGCTCCGGCGTCGAAGCT
61 CCCCCGCTAACTCCGCAGCGTACAAAATGGCTCCCATCAAGGTCGGCATCAACGGCTTCG
121 GTCGCATTGGCCGTATCGTCTTCCGCAACGCCGTCGAGCACCCGATATCCAGGTCGTGC
181 CCGTCAATGACCCCTTCATCGAGACCAAATACGCTGTGAGTTTTTGCCGGTTGCTGCTGC
241 CCCTCCCCCTCCCCCTCCTTGACCATCCTTGCCCCCTCCTTTTGCCGCAATCGCCCCAA
301 CACGCCTCAACAACACCACCGTCACCCCGCCGTCATGGAATTTTCTGGCCACGCTATGCT
361 GCCCCCTCCATGATATCATCAATGAGCGACGCACCACCAGCTTCACAATTGCTCGTGGTGC
421 GCTCTATTCAATTCGTGAGAGATGCAACGGCATTGCAGCATTGCCAGCAGTTCTCCTCCCG
481 CTCCATTGATGCGGCCAAGGCGCTGGCCAGTCTTGCTTTCTCATGTCAAGCAGACGGG
541 GAACCGCCATAAATCACAATCTCATCAGCCAATTACCCACATCTATGCTTTCCGCGCAGT
601 ATGCTGACCTCCGTCTCTTCTCCACGCCATAGGAGTACATGCTCAAGTATGACTCCTCCC
661 ACGGTAACCTCAAGGGCGACATCGCCGTCGACGGCAACGACCTGGTTGTCAACGGCAGCA
721 AGGTCAAGTTCTACTCCGAGCGCGACCCCGCCGATCCCCCTGGAAGGACACTGGCGCCG
781 ACTACATCGTCGAGTCCACTGGTGCTTACCACCACCGACAAGGCCAAGGCTCACTTGG
841 TTGGCGGTGCCAAGAAGGTCATCATCTCGGCTCCCTCTGCCGATGCCCCATGTACGTAA
901 TGGGCGTCAACGAGAAGACCTACGACGGCAAGGCCGATGTCATCTCCAACGCCTCGTGCA
961 CCACCAACTGCCTGGCTCCCCCTCGCCAAGGTCATCCACGACAAGTTCACCATGTGTTGAGG
1021 GTCTTATGACCACCGTCCACTCCTACACCGCCACCCAGAAGACCGTTGACGGCCCCCTCCG
1081 GCAAGGACTGGCGCGGTGGCCGTGGTGCTGCCCAGAACATCATCCCCAGCAGCACTGGCG
1141 CCGCCAAGGCCGTCGGCAAGGTCATCCCCGACCTCAACGGCAAGCTCACCGGCATGTCCA
1201 TGCGTGTGCCCCACTGCCAACGTCTCCGTGCTTGACCTGACTGTCCGCACCGAGAAGCCCCG
1261 CCAGCTACGAGGCCATCAAGGCGGCCATCAAGGAAGCCGCCAACGGTCCCCCTCAAGGGCA
1321 TCCTCGCCTACACCGAGGACGACATCGTCTCCAGCGACATGAACGGCAACACCAACTCCT
1381 CCATCTTCGATGCCAAGGCCGGCATCTCCCTCAACGACCACTTCGCCAAGCTGGTCTCCT
1441 GGTAACGACAACGAGTGGGGCTACTCCCGCCGTGCTCTGACCTCCTGGCTACATTGCCA

Abbildung 10/2

1501 AGGTTGATGCTGGCAAGTAAATGCTGCCTATTGCAGGAAAGCCAGTAGGGCGAAAACCTGG
1561 TTGGTGGCTAGTGGCCGAGAGACTGAATCAATATGAAATGCTCGCACCTATTTTCGGTTCG
1621 AGAAATTATCAGTACTCGGAAGAACACACATTCAAGTACATCCTCCGGGGGTGGAGCAGT
1681 GGAAATATGTTCCCCGGAGCAATGGTTTTAGTG TAGCCATGGAGAATAGACACGCCCCGTCC
1741 ATCCACATGTACTGTGTCCCGTCGCATGAAAGCGCTCTGTGACATGAGTCAAGCACGTAT
1801 TCATTGCATCGTTTCATGTTTCATGTTTTGCCATTTTCATCTGAGCTAGGTATCTAACCTGT
1861 GAACTCCTGCGTGAATGCCCCGCGTCCTGGCCATTTTCGACCTTTGACGCCAGAACACCAG
1921 CTCAGGCTCTGACTGTGCATGTATAAGCAAGTAGCGGCCGTGCCTCCGCTTTTCTGTAGA
1981 TCTGGTCATTATAGACGATCCATTACCGCGTCTCGCGATTATGATCCATCCTGCTCGTGC
2041 TGTTCGATCGATGCGTCGGAACAATAAAAGAGGCGATTTGTCAAAAATAGAGTCGATAAT
2101 AAGCCGGCGAAGAGAAGAAGACCCAAAATCCTCTAGGTAGGAGAAAAAAGAAAACGGAAA
2161 AAAGAGAAAGTATTTGTCCTGCTCGGCCGGCAGTGCCTCGTGGGCCGAGGGGGTGGGATA
2221 TCATCACGTACATGTACAACAAAAACGGGAACAACAGAAAAAGAAGAGCTC
SacI

14/29

Abbildung 11

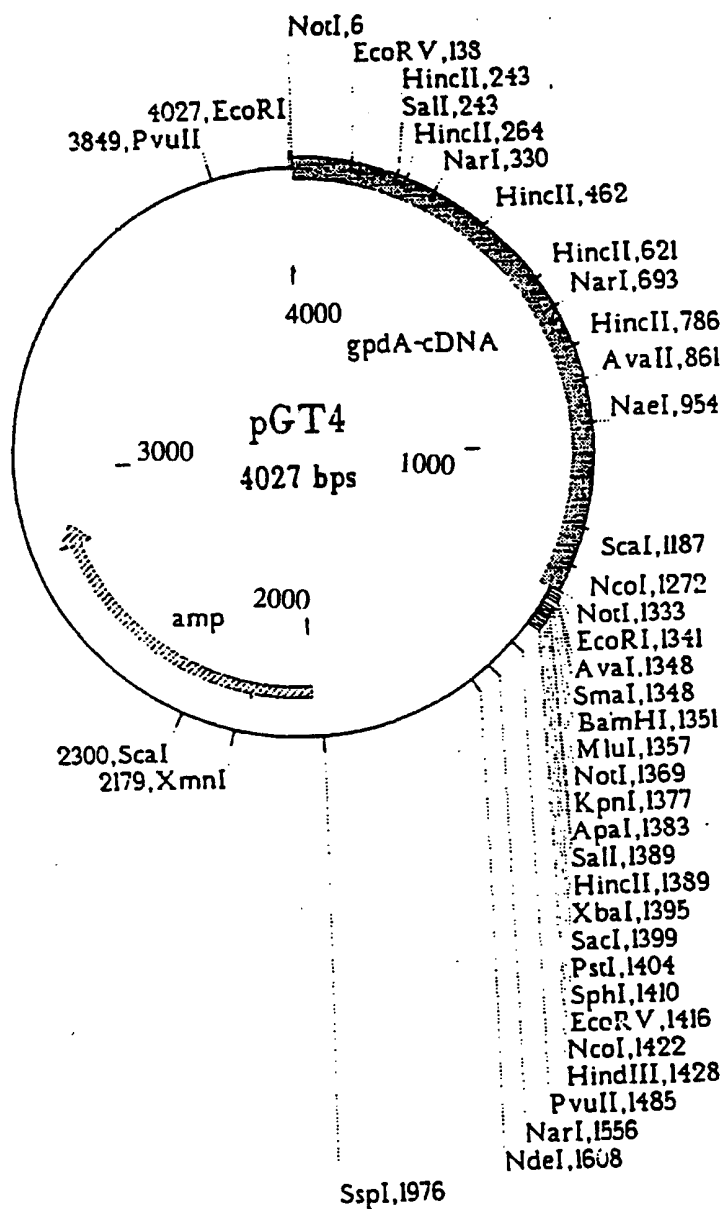


Abbildung 12

1 GAATTCGCGGCCGCGAGAACCTCATCCTCGCTATCCAGTCCCAACCTTCCGCGTACAAA
61 ATGGCTCCCATCAAGGTCGGCATCAACGGCTTCGGTCGCATTGGCCGTATCGTCTTCCGC
121 AACGCCGTCGAGCACCCGATATCCAGGTCGTCGCCGTCAATGACCCCTTCATCGAGACC
181 AAATACGCTGAGTACATGCTCAAGTATGACTCCTCCACGGTAACTTCAAGGGCGACATC
241 GCCGTCGACGGCAACGACCTGGTTGTCAACGGCAGCAAGGTCAAGTTCTACTCCGAGCGC
301 GACCCCGCCGCATCCCCTGGAAGGACACTGGCGCCGACTACATCGTCGAGTCCACTGGT
361 GTCTTCACCACCACCGACAAGGCCAAGGCTCACTTGGTTGGCGGTGCCAAGAAGGTCATC
421 ATCTCGGCTCCCTCTGCCGATGCCCCCATGTACGTAATGGGCGTCAACGAGAAGACCTAC
481 GACGGCAAGGCCGATGTCATCTCCAACGCCTCGTGCAACCACCAACTGCCTGGCTCCCCTC
541 GCCAAGGTCATCCACGACAAGTTCACCATGTTGAGGGTCTTATGACCACCGTCCACTCC
601 TACACCGCCACCCAGAAGACCGTTGACGGCCCCCTCCGGCAAGGACTGGCGCGGTGGCCGT
661 GGTGCTGCCCAGAACATCATCCCCAGCAGCACTGGCGCCGCCAAGGCCGTCCGCAAGGTC
721 ATCCCCGACCTCAACGGCAAGCTCACCGGCATGTCCATGCGTGTGCCCACTGCCAACGTC
781 TCCGTCGTTGACCTGACTGTCCGCACCGAGAAGCCCGCCAGCTACGAGGCCATCAAGGCG
841 GCCATCAAGGAAGCCGCCAACGGTCCCCCTCAAGGGCATCCTCGCCTACACCGAGGACGAC
901 ATCGTCTCCAGCGACATGAACGGCAACACCAACTCCTCCATCTTCGATGCCAAGGCCGGC
961 ATCTCCCTCAACGACCACTTCGCCAAGCTGGTCTCCTGGTACGACAACGAGTGGGGCTAC
1021 TCCCGCCGTGTCCTCGACCTCCTGGCCTACATTGCCAAGGTTGATGCTGGCAAGTAAATG
1081 CTGCCTATTGCAGGAAAGCCAGTAGGGCGAAAACCTGGTTGGTGGCTAGTGGCCGAGAGAC
1141 TGAATCAATATGAAATGCTCGCACCTATTTTCGGTCGAGAAATTATCAGTACTCGGAAGA
1201 ACACACATTCAAGTACATCCTCCGGGGGTGGAGCAGTGGAAATATGTTCCCCGGAGCAAT
1261 GGTTTAGTGTAGCCATGGAGAATAGACACGCCCGTCCATCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
1321 AAAAAAAAAAAAAGCGGCCGCGAATTC

Abbildung 13

*Xho*I
1 CTCGAGAACATTTCGTTGTGCACCGTGCTGGAGCTACCGATGGGGTTGCTGTTAGCGGGAC
61 AACCTTGTTGGAGTGGTGAGATCACCCGCTGTGGCTTCAACCACTGGGAGCTGCGGGCAG
121 CGGCGTGCCGCGAGAGGGTTGGACAGCGTCGCACAGGTGCCACCGGCGTGGTCAAGGAAG
181 GCCAGGTGCCCCCTTCTGCTGCTGGTCCCAAAATAGTCCAATGCAATATGTGCCTCATCC
241 GATGCCGCCTTGGTGTTTTAGGTGCTGACGTGCCGTCCATGTTTCGTAGCAGGTCTACGGA
301 GTACTCCAGCAAGTCCAGGTAGGCAAAGGTAATTATGTAACCTAGGTGCTACGTAAGGGA
361 GTCGCAATATCCATCCGTCGCGCCTCCCCCTCCTCGGAGCTGCCACCCACGCCTCCATGCT
421 AGTTAGGAGGTACCTACATATTATTTTTCCCTGTCCCTCCCTCCCTCCGTCCTTTCTCT
481 TCCTTTTCCCTCCTCCCCATACCACCCCTCACGAGAACCTCATCCTCGCTATCCAGTCCC
541 AACCTTCCGGTACGTACGCGACGCAGCTTTCGCCCTGGACGGGCGAGAGCTCCTCTTGCC
601 CCGCCTGCGAAGCTTGCTTGCCCTCTGCCGCTCCGGCGTCGAAGCTCCCCCGCTAACTCC
661 GCAGCGTACAAAATGGCTCCCATCAAGGTCGGCATCAACGGCTTCGGTTCGATTGGCCGT
721 ATCGTCTTCCGCAACGCCGTCGAGCACCCCGATATCCAGGTCGTCGCCGTCAATGACCCC
781 TTCATCGAGACCAAATAÇGCTGTGAGTTTTTGGCCGTTGCTGCTGCCCCCTCCCCCTCCCC
841 CTCCTTGACCATCCTTGCCCCCTCCTTTTGGCCGCAATCGCCCCCAACACGCCTCAACAAC
901 ACCACCGTCACCCCGCCGTCATGGAATTTTCTGGCCACGCTATGCTGCCCCCTCCATGATA
961 TCATCAATGAGCGACGCACCAACCAGCTTCACAATTGCTCGTGGTGCGCTCTATTCAATTC
1021 GTGAGAGATGCAACGGCATTGCAGATTGCCAGCAGTTCTCCCCGCTCCATTGATGCGG
1081 CCAAGGCGCCTGGCCCAGTCTTGCTTTCTCATGTCAAGCAGACGGGAACCGCCATAAAT
1141 CACAATCTCATCAGCCAATTCACCACATCTATGCTTTCCGCGCAGTATGCTGACCTCCGT
1201 CTCTTCTCCACGCCATAGGAGTACATGCTCAAGTATGACTCCTCCACGGTAACTTCAAG
1261 GGCGACATCGCCGTCGAC

*Sac*I
*Sal*I

Abbildung 14/1

*Xho*I
1 CTCGAGAACATTTCGTTGTGCACCGTGCTGGAGCTACCGATGGGGTTGTCGTTAGCGGGAC
61 AACCTTGTTGGAGTGGTGAGATCACCCGCTGTGGCTTCAACCACTGGGAGCTGCGGGCAG
121 CGGCGTGCCGCGAGAGGGTTGGACAGCGTCGCACAGGTGCCACCGGCGTGGTCAAGGAAG
181 GCCAGGTGCGCCTTCTGCTGCTGGTCCCAAAAATAGTCCAATGCAATATGTGCCTCATCC
241 GATGCCGCTTGGTGTTTTAGGTGCTGACGTGCCGTCCATGTTGCTAGCAGGTCTACGGA
301 GTACTCCAGCAAGTCCAGGTAGGCAAAGGTAATTATGTAACTAGGTGCTACGTAAGGGA
361 GTCGCAATATCCATCCGTCGCGCCTCCCCCTCCTCGGAGTGCCACCCACGCTCCATGCT
421 AGTTAGGAGGTACCTACATATTATTTTTCCCTGTCCCTCCCTCCCTCCGTCCTTTCTCT
481 TCCTTTTCTCCTCCCCATACCACCCCTCACGAGAACCTCATCCTCGCTATCCAGTCCC
CGAGAACCTCATCCTCGCTATCCAGTCCC
*Sac*I
541 AACCTTCCGGTACGTACGCGACGCAGCTTTCGCCCTGGACGGGCGAGAGCTCCTCTTGCC
AACCTTCCG-----
601 CCGCCTGCGAAGCTTGCTTGCCCTCTGCCGCTCCGGCGTCGAAGCTCCCCCGTAACTCC
-----INTRON 1-----
661 GCAGCGTACAAAATGGCTCCCATCAAGGTGGGCATCAACGGCTTCGGTCGCATTGGCCGT
----CGTACAAAATGGCTCCCATCAAGGTGGGCATCAACGGCTTCGGTCGCATTGGCCGT
721 ATCGTCTTCCGCAACGCCGTCGAGCACCCCGATATCCAGGTGTCGCCGTCAATGACCCC
ATCGTCTTCCGCAACGCCGTCGAGCACCCCGATATCCAGGTGTCGCCGTCAATGACCCC
781 TTCATCGAGACCAAATACGCTGTGAGTTTTTGCCGGTTGCTGCTGCCCCCTCCCCCTCCCC
TTCATCGAGACCAAATACGCT-----

Abbildung 14/2

841 CTCCTTGACCATCCTTGCCCCCTCTTTTGGCCGCAATCGCCCCAACACGCCTCAACAAC

901 ACCACCGTCACCCCGCCGTCATGGAATTTTCTGGCCACGCTATGCTGCCCCCTCCATGATA

961 TCATCAATGAGCGACGCACCACCAGCTTCACAATTGCTCGTGGTGCGCTCTATTCAATTC

1021 GTGAGAGATGCAACGGCATTGCAGCATTGCCAGCAGTTCCCTCCCGCTCCATTGATGCGG
-----INTRON 2-----
1081 CCAAGGCGCCTGGCCCAGTCTTGCTTTCTCATGTCAAGCAGACGGGGAACCGCCATAAAT

1141 CACAATCTCATCAGCCAATTACACCACATCTATGCTTTCCGCGCAGTATGCTGACCTCCGT

1201 CTCTTCTCCACGCCATAGGAGTACATGCTCAAGTATGACTCCTCCCACGGTAACTTCAAG
-----GAGTACATGCTCAAGTATGACTCCTCCCACGGTAACTTCAAG
Sali
1261 GGCACATCGCCGTCGACGGCAACGACCTGGTTGTCAACGGCAGCAAGGTCAAGTTCTAC
GGCAGATCGCCGTCGACGGCAACGACCTGGTTGTCAACGGCAGCAAGGTCAAGTTCTAC
1321 TCCGAGCGCGACCCCGCCGATCCCCCTGGAAGGACACTGGCGCCGACTACATCGTCGAG
TCCGAGCGCGACCCCGCCGATCCCCCTGGAAGGACACTGGCGCCGACTACATCGTCGAG
1381 TCCACTGGTGTCTTCACCACCACCGACAAGGCCAAGGCTCACTTGGTTGGCGGTGCCAAG
TCCACTGGTGTCTTCACCACCACCGACAAGGCCAAGGCTCACTTGGTTGGCGGTGCCAAG
1441 AAGGTCATCATCTCGGCTCCCTCTGCCGATGCCCCCATGTACGTAATGGGCGTCAACGAG
AAGGTCATCATCTCGGCTCCCTCTGCCGATGCCCCCATGTACGTAATGGGCGTCAACGAG
1501 AAGACCTACGACGGCAAGGCCGATGTCATCTCCAACGCCTCGTGACCAACCAACTGCCTG
AAGACCTACGACGGCAAGGCCGATGTCATCTCCAACGCCTCGTGACCAACCAACTGCCTG
1561 GCTCCCCCTCGCCAAGGTATCCACGACAAGTTACCATTTGTTGAGGGTCTTATGACCACC
GCTCCCCCTCGCCAAGGTATCCACGACAAGTTACCATTTGTTGAGGGTCTTATGACCACC
1621 GTCCACTCCTACACCGCCACCCAGAAGACCGTTGACGGCCCCCTCCGGCAAGGACTGGCGC
GTCCACTCCTACACCGCCACCCAGAAGACCGTTGACGGCCCCCTCCGGCAAGGACTGGCGC
1681 GGTGGCCGTGGTGTGCCCAGAACATCATCCCCAGCAGCACTGGCGCCGCCAAGGCCGTC
GGTGGCCGTGGTGTGCCCAGAACATCATCCCCAGCAGCACTGGCGCCGCCAAGGCCGTC

Abbildung 14/3

1741 GGCAAGGTCATCCCCGACCTCAACGGCAAGCTCACCGGCATGTCCATGCGTGTGCCCCACT
GGCAAGGTCATCCCCGACCTCAACGGCAAGCTCACCGGCATGTCCATGCGTGTGCCCCACT

1801 GCCAACGTCTCCGTGCTTGACCTGACTGTCCGCACCGAGAAGCCCGCCAGCTACGAGGCC
GCCAACGTCTCCGTGCTTGACCTGACTGTCCGCACCGAGAAGCCCGCCAGCTACGAGGCC

1861 ATCAAGGCGGCCATCAAGGAAGCCGCCAACGGTCCCCCTCAAGGGCATCCTCGCCTACACC
ATCAAGGCGGCCATCAAGGAAGCCGCCAACGGTCCCCCTCAAGGGCATCCTCGCCTACACC

1921 GAGGACGACATCGTCTCCAGCGACATGAACGGCAACACCAACTCCTCCATCTTCGATGCC
GAGGACGACATCGTCTCCAGCGACATGAACGGCAACACCAACTCCTCCATCTTCGATGCC

1981 AAGGCCGGCATCTCCCTCAACGACCACTTCGCCAAGCTGGTCTCCTGGTACGACAACGAG
AAGGCCGGCATCTCCCTCAACGACCACTTCGCCAAGCTGGTCTCCTGGTACGACAACGAG

2041 TGGGGCTACTCCCGCCGTGTCCTCGACCTCCTGGCCTACATTGCCAAGGTTGATGCTGGC
TGGGGCTACTCCCGCCGTGTCCTCGACCTCCTGGCCTACATTGCCAAGGTTGATGCTGGC

2101 AAGTAAATGCTGCCTATTGTCAGGAAAGCCAGTAGGGCGAAAACCTGGTTGGTGGCTAGTGG
AAGTAAATGCTGCCTATTGTCAGGAAAGCCAGTAGGGCGAAAACCTGGTTGGTGGCTAGTGG

2161 CCGAGAGACTGAATCAATATGAAATGCTCGCACCTATTTTCGGTCGAGAAATTATCAGTA
CCGAGAGACTGAATCAATATGAAATGCTCGCACCTATTTTCGGTCGAGAAATTATCAGTA

2221 CTCGGAAGAACACACATTCAAGTACATCCTCCGGGGGTGGAGCAGTGGAATATGTTCCC
CTCGGAAGAACACACATTCAAGTACATCCTCCGGGGGTGGAGCAGTGGAATATGTTCCC

2281 CGGAGCAATGGTTTGTAGTGTAGCCATGGAGAATAGACACGCCCCGTCCATCCACATGTACTG
CGGAGCAATGGTTTGTAGTGTAGCCATGGAGAATAGACACGCCCCGTCCATCCA

2341 TGTCCCGTCGCATGAAAGCGCTCTGTGACATGAGTCAAGCACGTATTCATTGCATCGTTT

2401 CATGTTTCATGTTTTGCCATTTTCATCTGAGCTAGGTATCTAACCTGTGAACTCCTGCGTGA

2461 ATGCCCCGCGTCCTGGCCATTTTCGACCTTTGACGCCAGAACACCAGCTCAGGCTCTGACT

2521 GTGCATGTATAAGCAAGTAGCGGCCGTGCCTCCGCTTTTCTGTAGATCTGGTCATTATAG

2581 ACGATCCATTACCGCGTCTCGCGATTATGATCCATCCTGCTCGTGCTGTTGATCGATGCG

Abbildung 14/4

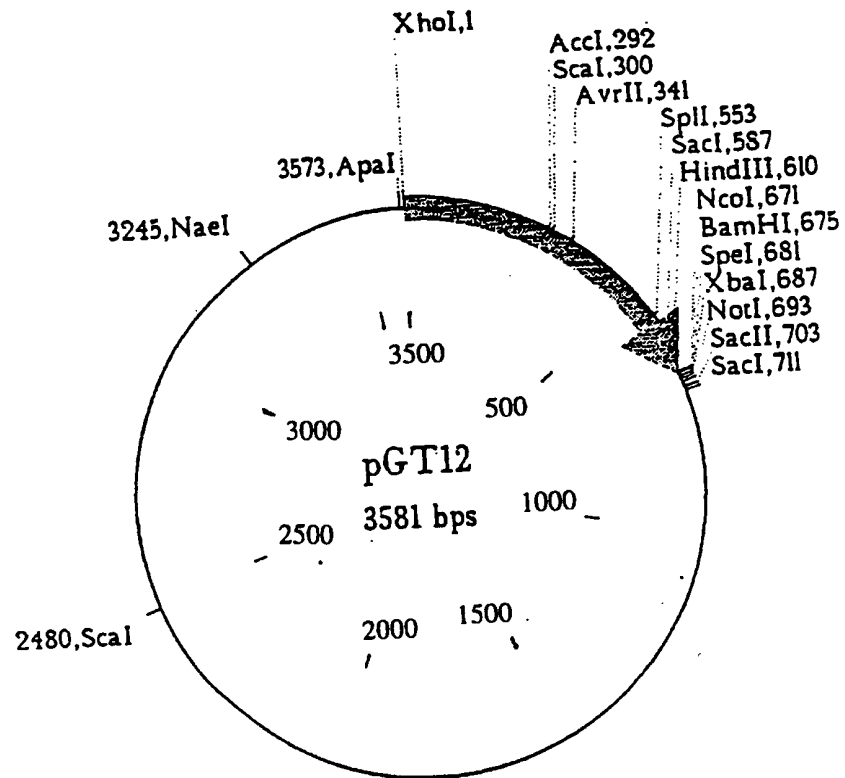
2641 TCGGGAACAATAAAAGAGGCGATTTGTCAAAAATAGAGTCGATAATAAGCCGGCGAAGAG
2701 AAGAAGACCCAAAATCCTCTAGGTAGGAGAAAAAGAAAACGGAAAAAGAGAAAGTATT
2761 TGTCTGCTCGGCCGGCAGTGCCTCGTGGGCCGAGGGGTGGGATATCATCACGTACATG
SacI
2821 TACAACAAAACGGGAACAACAGAAAAAGAAGAGCTC

21/29

Abbildung 15

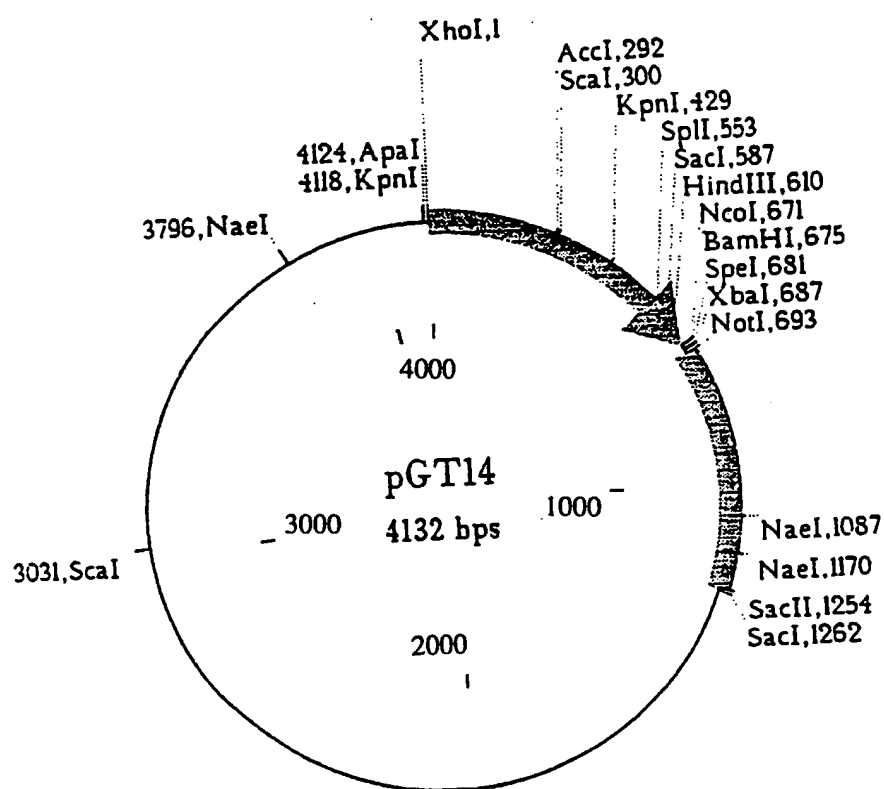
					5					10					15
1	Met	Ala	Pro	Ile	Lys	Val	Gly	Ile	Asn	Gly	Phe	Gly	Arg	Ile	Gly
16	Arg	Ile	Val	Phe	Arg	Asn	Ala	Val	Glu	His	Pro	Asp	Ile	Gln	Val
31	Val	Ala	Val	Asn	Asp	Pro	Phe	Ile	Glu	Thr	Lys	Tyr	Ala	Glu	Tyr
46	Met	Leu	Lys	Tyr	Asp	Ser	Ser	His	Gly	Asn	Phe	Lys	Gly	Asp	Ile
61	Ala	Val	Asp	Gly	Asn	Asp	Leu	Val	Val	Asn	Gly	Ser	Lys	Val	Lys
76	Phe	Tyr	Ser	Glu	Arg	Asp	Pro	Ala	Ala	Ile	Pro	Trp	Lys	Asp	Thr
91	Gly	Ala	Asp	Tyr	Ile	Val	Glu	Ser	Thr	Gly	Val	Phe	Thr	Thr	Thr
106	Asp	Lys	Ala	Lys	Ala	His	Leu	Val	Gly	Gly	Ala	Lys	Lys	Val	Ile
121	Ile	Ser	Ala	Pro	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Met	Tyr	Val	Met	Gly	Val
136	Asn	Glu	Lys	Thr	Tyr	Asp	Gly	Lys	Ala	Asp	Val	Ile	Ser	Asn	Ala
151	Ser	Cys	Thr	Thr	Asn	Cys	Leu	Ala	Pro	Leu	Ala	Lys	Val	Ile	His
166	Asp	Lys	Phe	Thr	Ile	Val	Glu	Gly	Leu	Met	Thr	Thr	Val	His	Ser
181	Tyr	Thr	Ala	Thr	Gln	Lys	Thr	Val	Asp	Gly	Pro	Ser	Gly	Lys	Asp
196	Trp	Arg	Gly	Gly	Arg	Gly	Ala	Ala	Gln	Asn	Ile	Ile	Pro	Ser	Ser
211	Thr	Gly	Ala	Ala	Lys	Ala	Val	Gly	Lys	Val	Ile	Pro	Asp	Leu	Asn
226	Gly	Lys	Leu	Thr	Gly	Met	Ser	Met	Arg	Val	Pro	Thr	Ala	Asn	Val
241	Ser	Val	Val	Asp	Leu	Thr	Val	Arg	Thr	Glu	Lys	Pro	Ala	Ser	Tyr
256	Glu	Ala	Ile	Lys	Ala	Ala	Ile	Lys	Glu	Ala	Ala	Asn	Gly	Pro	Leu
271	Lys	Gly	Ile	Leu	Ala	Tyr	Thr	Glu	Asp	Asp	Ile	Val	Ser	Ser	Asp
286	Met	Asn	Gly	Asn	Thr	Asn	Ser	Ser	Ile	Phe	Asp	Ala	Lys	Ala	Gly
301	Ile	Ser	Leu	Asn	Asp	His	Phe	Ala	Lys	Leu	Val	Ser	Trp	Tyr	Asp
316	Asn	Glu	Trp	Gly	Tyr	Ser	Arg	Arg	Val	Leu	Asp	Leu	Leu	Ala	Tyr
331	Ile	Ala	Lys	Val	Asp	Ala	Gly	Lys							

Abbildung 16

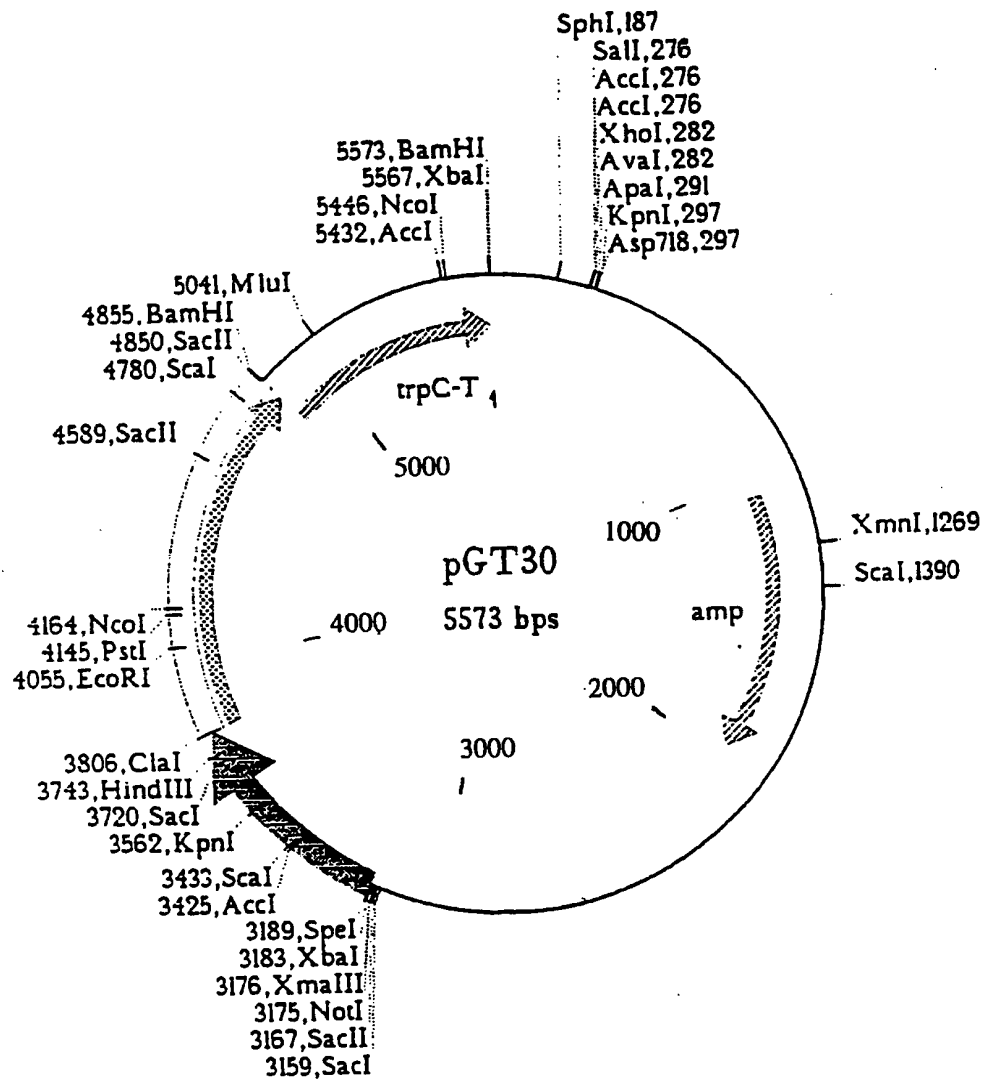


23/29

Abbildung 17



24/29
Abbildung 18



25/29

Abbildung 19

					5						10					15
1	Met	Lys	Ile	Cys	Pro	Ile	Leu	Asn	Ser	Lys	Ala	Gly	His	Trp	Gly	
16	Asp	Pro	Thr	Leu	Thr	Gly	Ser	Ala	Phe	Asp	Phe	Arg	Ser	Asp	Ala	
31	Ile	Thr	Thr	Pro	Ser	His	Gly	Met	Leu	Glu	Ala	Ile	Ala	Gly	Ala	
46	Thr	Leu	Asn	Asp	Asp	Val	Tyr	Gly	Glu	Asp	Gln	Leu	Thr	Arg	Ser	
61	Phe	Glu	Glu	His	Met	Ala	Ser	Ile	Cys	Gly	Lys	Glu	Ala	Ala	Leu	
76	Phe	Val	Val	Ser	Gly	Thr	Met	Ala	Asn	Gln	Ile	Ala	Leu	Gly	Ala	
91	Leu	Ser	Arg	Arg	Cys	Thr	Gly	Val	Leu	Ala	Asp	Ala	Thr	Ser	His	
106	Ile	Val	His	Phe	Glu	Ala	Gly	Gly	Leu	Ala	Gly	Leu	Ser	Gly	Ala	
121	Ser	Ile	Gln	Pro	Val	Arg	Pro	Ala	Asn	Gly	His	Tyr	Leu	Thr	Leu	
136	Asp	Asp	Val	Glu	Arg	His	Ala	Val	Thr	Thr	Asn	Met	Ile	Glu	Arg	
151	Leu	Pro	Thr	Ser	Ile	Ile	Ser	Leu	Glu	Asn	Thr	Ala	His	Gly	Ser	
166	Val	Ile	Pro	Leu	Gln	Glu	Leu	Arg	Lys	Met	Lys	Ala	Trp	Ala	Asp	
181	Glu	Gln	Glu	Ile	Ala	Ile	His	Ile	Asp	Gly	Ala	Arg	Ile	Trp	His	
196	Ala	Val	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Leu	Lys	Glu	Ile	Ala	Gly	Cys	
211	Cys	Asp	Ala	Met	Thr	Leu	Ser	Phe	Gly	Lys	Gly	Leu	Ala	Ala	Pro	
226	Ile	Gly	Ser	Ala	Ile	Val	Gly	Ser	Arg	Asp	Leu	Ile	Ala	Arg	Ala	
241	Arg	Arg	Leu	Arg	Gln	Ser	Ile	Gly	Gly	Gly	Val	Arg	Lys	Ala	Gly	
256	Ala	Ile	Val	Ala	Ala	Ala	Trp	Gln	Ala	Met	Ile	Glu	Asn	Phe	Gly	
271	Pro	Gly	Asp	Val	Asp	Thr	Arg	Gly	Ile	Ile	Gln	Arg	Thr	His	Val	
286	Leu	Ala	Arg	Ala	Val	Ala	Asn	Met	Trp	Thr	Ser	Arg	Gly	Gly	Leu	
301	Leu	Leu	Arg	Pro	Val	Met	Thr	Asn	Leu	Val	Trp	Leu	Asp	Leu	Lys	
316	Ser	Ala	Gly	Leu	Asp	Lys	Ser	Thr	Leu	Asp	Thr	Ala	Ala	Gln	His	
331	Arg	Asp	Ile	Arg	Ile	Arg	Ala	Pro	Arg	Ile	Val	Leu	His	His	Gln	
346	Ile	Ser	Thr	Asp	Ala	Met	Arg	Arg	Leu	Glu	Ala	Val	Phe	Glu	Glu	
361	Val	Leu	Glu	Lys	Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Pro	Leu	Arg	Ser	Arg	Ala	
376	Glu	Arg	Ala	Gly	Leu	Glu	Arg	Leu								

26/29
Abbildung 20/1

1 GTCGACCCGGGAGCAACGCAGACACGATGCGCTCAAAGGGGACGTCGCGGTTGGCATGT
 61 GCCTCTGTTCATGACGGACATGATCTGCCGAGCACCAGCTCGAAGGTGTCGTCCTCGTCG
 121 AGCAGGACTCGCATGCACTGCAGAGTGGCCAAGGGAGCCACCATGTTCTCCAGCTCCGGC
 181 CGGTGCGGGTTGGCAACGGGCGCTCCGATGGTTGCATCCTCGGCTCCAGTGAGGCGAAAG
 241 TGGCCACGCGAAACGCTGCCAGCAGCAGGCGTAGGCGGTTACTTGCTGGGAGCGGCAG
 301 AAGGCCAGGAGTTCTTTGTGTACCGATCCATCGATCTGGAAGGAGATCTTGCCAGTTTCG
 361 CCAGATGGGATAGCTGGCCGGGGAAGCTCTGTGAGGAGCTCGGCCGGTGTGTTGTTATCG
 421 AGCTGCTCGATCCAGTATCCGAGCTGCCTTTCTGCTCAGCGACCTGCTCGTCTGTTTC
 481 TGCCAAGTCGTCAAGTCACGGTATTGAATGGGAATTGACCCAAAGGACAAGCCGAAATC
 541 GATTTCCCTGCGAGGCGGCCGTGTAGAGTTCTCCAAGCTCCTGCTGAATAATGTGAGAGA
 601 GACCGGCTGTCTGAGATGATATGGTGTACAACAATGGAAAGAATATGTGATCCTCGGCC
 661 ACCTTCAACAATGCAACTCTCCAAGCTGGCTCAGACTCTAGGTGCAACTTCATGTTTGT
 721 TCCTCTGCCAGGAGCTGGGCCAAATCGCGGCTCGAGGCATCAACAATCCTCAACCCTCTT
 781 TCGAGGCCCGAGGCGTGACAACCTGTACGCCACGCCATCCTGCTCCTTGAACGTCGT
 841 CGGAGCGTCTCGTGGCGCTGCGTCAGAGCGCGGAGGCGAGCGTTCAGCGCATCGATGTCG
 901 AGATGGCCCCGAAGTCGGATCGCGGCCGCGTAATGTCCCAGCTCGCACCAGGCTTCAGC
 961 TGGTGCAGGAACCAAGTCTGCCCTGGGCAAAGGATTGCTCGACAGGTTCCGAGTATCGG
 1021 TTCGAAGAGATGGAACCTGCCCCGAGACGGGTTGGCAAGGCGATCATATGCAATGGTTGTCT
 1081 CCGATGGCGCCCATGTTGACCAAGAAAGCAAAAGGCTCTATAATCTGGCAATGGTTGTCT
 1141 ATCTGTTAGTAAACCTAGTGTAGTCAGTATGTACAATCCATCTCATGAAGTTCTGTAGC
 1201 TGCTGTAGTTTTCGATTTCGAATGGCTAGTTGCTGAGTTGTGGCGAGTCCGGCTTTGTGC
 1261 TGCTACCACAGGTGTAAGTGGCTCGTAGGTCGAGCTTCCGACAGTATCGTTGACCGGCA
 1321 CAGAAAGCAAGTAGCTATTTGTGTCCGATAAAGAGTGGATCTCCTGAGTTTTTGTGGTG
 1381 CTTTTTCTTTTTCCAAATTCGAGGAGATGTTCCAGTAAATAGTAAGCGACTGAAGGAAC
 1441 TGAGTTCAGTTCGTGGTCAAGTAGATGGAGACTTGTAAGGTAATCTGACAGCCAAGGGAT
 1501 TGCCCTCCTCGGGGTTTCCACATATTCGAAGCTATGATACTACTCCTTTACTCCGTATTAC
 1561 CTTGTTAATAATCCCTGAAGGGTTCGAAACTTCGTGAGACTGTGGACACGTGGGCTTACA
 1621 CCCCCACGATCGACGTACGAGTATCGGTACCTTAAACCAAGCATAGAGTTACTAATAGA
 1681 ATAAGTACCTATACTCATCAGCAACAATATCCCTCCATCAAGATCGAGGCATTGCTGC
 1741 AGCCTGCCCATCGCAATAGATCCTCTGACATTAACAGAAGAGAGTACCTACGCATATAAA
 1801 CTACTATATAAAATACTAGTAGCGGTTAAGCCAATAAGAAGCTTCGTCTGGGGCTTGT
 1861 ACATCGGCGGGATTTGTGATGCTAGAAGGGTGTATATCTGGAGGCCATCCAGCCGATTG
 1921 TCCTGCATTCTCTCGTAGATTACATCAC

 1953 ATG AAG ATT TGC CCG ATA CTG AAT TCC AAG GCA GGT CAT TGG GGA
 Met Lys Ile Cys-Pro Ile Leu Asn Ser Lys Ala Gly His Trp Gly

 1998 GAT CCC ACT CTC ACT GGC TCA GCC TTT GAT TTC AGG A GTAAGTTAT
 Asp Pro Thr Leu Thr Gly Ser Ala Phe Asp Phe Arg S -----

 2044 CAAATCGATTCTTGTCTCTATCCTATCCTTCCCTGTTACCGGAGCTGACAGCTATCTGA
 -----INTRON-----

 2103 TATTGTAG GC GAC GCT ATT ACT ACA CCA TCC CAT GGA ATG CTG GAA
 -----er Asp Ala Ile Thr Thr Pro Ser His Gly Met Leu Glu

 2149 GCA ATC GCC GGG GCC ACG CTC AAT GAT GAT GTC TAT GGC GAG GAC
 Ala Ile Ala Gly Ala Thr Leu Asn Asp Asp Val Tyr Gly Glu Asp

 2194 CAG CTA ACA CGG TCC TTC GAG GAG CAC ATG GCG AGC ATC TGT GGC
 Gln Leu Thr Arg Ser Phe Glu Glu His Met Ala Ser Ile Cys Gly

 2239 AAA GAA GCA GCT CTG TTT GTT GTG TCC GGG ACC ATG GCC AAC CAG
 Lys Glu Ala Ala Leu Phe Val Val Ser Gly Thr Met Ala Asn Gln

 2284 ATT GCC TTA GGA GCG CTG TCA CGA CGA TGC ACA TGT GTA CTA GCA
 Ile Ala Leu Gly Ala Leu Ser Arg Arg Cys Thr Gly Val Leu Ala

 2329 GAT GCT ACC TCT CAT ATC GTA CAT TTT GAG GCC GGT GGC CTT GCC
 Asp Ala Thr Ser His Ile Val His Phe Glu Ala Gly Gly Leu Ala

 2374 GGT CTC TCC GGG GCA TCC ATC CAG CCC GTG CGG CCG GCG AAT GGG
 Gly Leu Ser Gly Ala Ser Ile Gln Pro Val Arg Pro Ala Asn Gly

Abbildung 20/2

2419 CAT TAT CTC ACC CTT GAT GAT GTG GAA CGA CAC GCA GTG ACC ACC
 His Tyr Leu Thr Leu Asp Asp Val Glu Arg His Ala Val Thr Thr
 2464 AAC ATG ATA GAA CGG TTG CCC ACC AGC ATC ATC AGC CTC GAG AAC
 Asn Met Ile Glu Arg Leu Pro Thr Ser Ile Ile Ser Leu Glu Asn
 2509 ACA GCT CAC GGC AGC GTA ATC CCA CTA CAA GAG CTC CGC AAG ATG
 Thr Ala His Gly Ser Val Ile Pro Leu Gln Glu Leu Arg Lys Met
 2554 AAG GCT TGG GCT GAC GAG CAG GAG ATC GCC ATT CAC ATC GAC GGT
 Lys Ala Trp Ala Asp Glu Gln Glu Ile Ala Ile His Ile Asp Gly
 2599 GCG CGG ATA TGG CAC GCC GTG GCA GGC GGG GGC GGT AGT CTA AAG
 Ala Arg Ile Trp His Ala Val Ala Gly Gly Gly Gly Ser Leu Lys
 2644 GAG ATC GCG GGC TGC TGC GAC GCG ATG ACC CTC TCC TTC GGT AAA
 Glu Ile Ala Gly Cys Cys Asp Ala Met Thr Leu Ser Phe Gly Lys
 2689 GGG CTC GCA GCA CCG ATA GGA TCG GCC ATC GTG GGC TCG AGG GAC
 Gly Leu Ala Ala Pro Ile Gly Ser Ala Ile Val Gly Ser Arg Asp
 2734 CTT ATA GCA AGG GCG AGA AGA CTG CGC CAA AGC ATC GGC GGC GGC
 Leu Ile Ala Arg Ala Arg Arg Leu Arg Gln Ser Ile Gly Gly Gly
 2779 GTC CGC AAG GCT GGG GCC ATT GTG GCT GCA GCT TGG CAG GCC ATG
 Val Arg Lys Ala Gly Ala Ile Val Ala Ala Ala Trp Gln Ala Met
 2824 ATA GAG AAC TTT GGT CCC GGC GAT GTC GAC ACA CGG GGC ATC ATC
 Ile Glu Asn Phe Gly Pro Gly Asp Val Asp Thr Arg Gly Ile Ile
 2869 CAG AGA ACA CAT GTG TTG GCG AGA GCG GTG GCC AAC ATG TGG ACC
 Gln Arg Thr His Val Leu Ala Arg Ala Val Ala Asn Met Trp Thr
 2914 TCG AGG GGC GGT CTG CTT CTT CGC CCG GTG ATG ACG AAC CTT GTC
 Ser Arg Gly Gly Leu Leu Leu Arg Pro Val Met Thr Asn Leu Val
 2959 TGG CTC GAC TTG AAG AGC GCT GGT CTC GAC AAG TCC ACA CTG GAC
 Trp Leu Asp Leu Lys Ser Ala Gly Leu Asp Lys Ser Thr Leu Asp
 3004 ACG GCT GCT CAG CAC CGT GAC ATA CGC ATC AGG GCA CCA CGC ATC
 Thr Ala Ala Gln His Arg Asp Ile Arg Ile Arg Ala Pro Arg Ile
 3049 GTT CTG CAT CAG CAG ATA TCA ACC GAT GCT ATG CGA CGA CTG GAG
 Val Ile Val Leu His Gln Ile Thr Asp Ala Met Arg Arg Leu Glu
 3094 GCG GTG TTC GAG GAG GTG TTA GAG AAA AAG GCA AGT CAA AGT CCT
 Ala Val Phe Glu Glu Val Leu Glu Lys Lys Ala Ser Gln Ser Pro
 3139 TTG CGG TCA AGA GCG GAG CGA GCA GGT CTA GAA CGC CTT TAG
 Leu Arg Ser Arg Ala Glu Arg Ala Gly Leu Arg Leu ***
 3181 TCAAACAACTGGATACCCGGAGTGGGGTCATTGCTGTTGGGCCATATTCATGGATCAA
 3241 GGAGGTACTGACTATCTAAGGTTTCGCTGTGTCAGGGGTTCCAAGTACTCAAGGGAGGGAAAA
 3301 GGGTAGAGGATAGATAGGCAAGACCTGAGCACATGTGGTATTTTCATCCATCCTTCAATGC
 3361 CCTTGTTGTGGGCAAGATCGGCTACCTATGACCCACAAGCATCGAGTCGAGTGTGTTGT
 3421 TTCTATTTTGTAGTCACTGGTGTCTCCATCGGGCCAGGAAGCTTAGACCATCGGCCACGAG
 3481 ACATGATCCGTGCTTGACAGCATATCGCCCTAAATCAGCAAGCCCCGAAAAATGAATCCA
 3541 TCACTCTTTTGTCTCTTTGGTCCGGAATAATCGCCCCGTGGAACCTCATCTGGTC
 3601 TGGAAATCGACGAGAGTCAACCGCAGAGTAGACACGATGGTTTCATCCACAACAGAACAGA
 3661 GCCCCTCCACGGATGGCCAGTTTCGCGCAACCCCTTGAGACATGTGCGAGCGAGGTGTTTCT
 3721 TTAGGTCCAACACCATCGACTACGAGTAGTTGTATGAATGTATCTATTTTTTTTGGCCGC
 3781 TTATCCTTTCCCGGACTTGTATGATCTGTGACTGGCATAGCATCCCTGCCGCCGGGGACC
 3841 TAGCCCGGCGCCTCATCCGCCTTGCCAGACGGAATGAATAGTCATCTGCACGAGGGGTAG
 3901 TGAGCGCTCAGGAATAGGACGATCCGTTAAGCACAGATGGATTAACTGTGTTTGTGCT
 3961 TGCGGCGACCCCTT

	-26	-14	-8	
	CAGCCGATTCTCCTGCATTCATCTCGTAGATTCAATCACCATGAAG.....			
15g	ccccgactccccgacccgA	----->	9/SG108	
	ggggggggggggcccccgA	----->	28/SG118	
17g	ccccancgcccccgA	----->	31/SG121	
16g	ccgaaggcttgggctgacgagacgccccgA	----->	12/SG117	
	...ggggggggggggcccccgA	----->	1/SG108	
	...ggggggggggggcccccgA	----->	4/SG108	
A	----->	7/SG108	
	ggggggggggggggggggggCTA	----->	29/SG118	
10g	ctactactactagggccacgcgtcgactagcatgA	----->	8/002	
	ggggggggcgatcgactagA	----->	17/SG113	
	ggggggggcgatcgactagA	----->	12/SG116	
	gggggggggggCA	----->	11/SG117	
	ggggggggggggggngatcgactagA	----->	13/SG117	
	ggggggggggggggggatcgactagA	----->	14/SG117	
	ggggaggggggggaaggtcgactagA	----->	15/SG117	
	ggggggggggggggngngatcgactagA	----->	16/SG117	
	ggggggggggagggggatcgactagA	----->	17/SG117	
	ggggggggggggggngatcgactagA	----->	18/SG117	
	ggtggggggggggggngatcgactagA	----->	19/SG117	
	ggggggngggggggggngatcgactagA	----->	20/SG117	
	ggggggngggggggggngatcgactagA	----->	21/SG117	
	ggggggggggatcgactagA	----->	22/SG117	
	ggggggggggggggngatcgactagA	----->	23/SG118	
	ggggggggggggggcgatcgactagA	----->	24/SG118	
	ggggggggggggggngngatcgactagA	----->	25/SG118	
	ggggggggggggggcgatcgactagA	----->	26/SG118	
	ggggggggggggggcgatcgactagA	----->	27/SG118	
	ggggggggggggggngnggtcgactagA	----->	32/SG121	
	ggggggggggggcgatcgactagA	----->	33/SG121	
	gggggggggggggggnacgatcgactagA	----->	34/SG121	
	ggggggggggggcgggggcgatcgactagA	----->	35/SG121	
	ggggggggggggggggcgatcgactagA	----->	36/SG121	

+1149
 CGC CTT | TAGTCAAATACTGGATACCCGGAGTGGGGTCATTGCTGTTGGGCCA.....
 Arg Leu ***

Tvp1: (17%)
 +1154/5
 -----TAGTC + 17A 3/SG118
 -----TAGTC + 17A 9/SG118

Tvp2: (8%)
 +1194/45
 -----TAGTCAAATACTGGATACCCGGAGTGGGGTCATTGCTGTTGGG + 35A 39/SG120

+1270 +1335
AAAGGGTAGAGGATAGATAGGCAAGACCTGAGCACATGTGGTATTTTCATCCATCCTTCAATGCCCT....

Tvp3: (17%)
 +1304/155
AAAGGGTAGAGGATAGATAGGCAAGACCTGAGCAC + 18A 36/SG123
AAAGGGTAGAGGATAGATAGGCAAGACCTGAGCAC + 27A 37/SG123

Tvp4: (50%)
 +1316/167
AAAGGGTAGAGGATAGATAGGCAAGACCTGAGCACATGTGGTATTTTC + 16A 31/SG121
AAAGGGTAGAGGATAGATAGGCAAGACCTGAGCACATGTGGTATTTTC + 43A 32/SG121
AAAGGGTAGAGGATAGATAGGCAAGACCTGAGCACATGTGGTATTTTC + 20A 33/SG121
AAAGGGTAGAGGATAGATAGGCAAGACCTGAGCACATGTGGTATTTTC + 20A 34/SG120
AAAGGGTAGAGGATAGATAGGCAAGACCTGAGCACATGTGGTATTTTC + 17A 35/SG120
AAAGGGTAGAGGATAGATAGGCAAGACCTGAGCACATGTGGTATTTTC + 22A 38/SG120

Tvp5: (8%)
 +1320/171
AAAGGGTAGAGGATAGATAGGCAAGACCTGAGCACATGTGGTATTTTCATCC + 27A 40/SG120

This Page Blank (uspto)